

Über die fermentative Oxydation von Hydroxypyridinen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

1960

vorgelegt von

Klaus Eichner

aus Berlin

Über die fermentative Oxydation von Hydroxypyridinen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Klaus Eichner

aus Berlin

1. Referent: Prof. Dr. Helmut Loth

2. Referent: Prof. Dr. Fritz Eiden

Letzter Tag der mündlichen Prüfung: 29. 1. 1968

Tag der Promotion:

 7. Mrz. 1968

Meiner Familie in Dankbarkeit gewidmet

Blower F. 1911 in Eastland 1911



Die vorliegende Arbeit wurde im Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin unter Anleitung von Herrn Professor Dr. Helmut Loth durchgeführt.

Sowohl für die Überlassung des Themas als auch für die stete Bereitschaft zur Erörterung aller Probleme in Zusammenhang mit dieser Arbeit möchte ich Herrn Professor Dr. Helmut Loth herzlich danken.

Herrn Professor Dr. Gerhard Schenk gebührt mein besonderer Dank für das wohlwollende Interesse, welches er meiner Arbeit und meiner Fortbildung am Institut entgegenbrachte.

Herrn Professor Dr. Fritz Eiden bin ich für die Unterstützung meiner Fortbildung am Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin und für das 2. Referat sehr dankbar.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
ALLGEMEINER TEIL	
Untersuchungen an Pyridinolen	9
Untersuchungen an Pyridindiolen	13
Reaktionen mit 2,5-Pyridindiol	24
Chromatographische Untersuchung der Oxydationsprodukte des 2,5-Pyridindiols	38
Herstellung der Oxydationsprodukte A-C	42
Präparative chromatographische Auftrennung der Oxydationsprodukte A-C und Gewinnung des Oxydationsproduktes A	44
Darstellung des Oxydationsproduktes B durch Oxydation mit Tetrachlor-o-chinon	46
Untersuchungen zur Strukturaufklärung der Oxydationsprodukte A und B	47
DISKUSSION	72
EXPERIMENTELLER TEIL	79
Allgemeine Angaben	
Lösungsmittel	79
Schmelzpunktsbestimmung	80
Elementaranalysen	80
Molekulargewichtsbestimmungen	80
UV-Spektren	80
IR-Spektren	81
NMR-Spektren	81
Massenspektren	81
Spezielle Angaben	
Ferment	82

	Seite
Wasserstoffperoxid	82
Pufferstammlösungen	83
Pyridinole	83
Pyridindiole	84
2,5-Diacetoxypyridin	85
2,5-Dibenzoxypyridin	86
Versuchsansätze	89
Dünnschichtchromatographie	89
Präparative Gewinnung der Oxydations- produkte A-C	89
Säulenchromatographische Gewinnung des Oxydationsproduktes A	90
Acetylierung des Oxydationsproduktes A	91
Benzoylierung des Oxydationsproduktes A	91
Präparative Gewinnung des Oxydations- produktes B	91
Reduzierende Acetylierung des Oxydationsproduktes B	92
ZUSAMMENFASSUNG	94
LITERATURVERZEICHNIS	96

I EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

PLANCHE (53) beobachtete im Jahre 1810, daß Guajakholz in Gegenwart frischer Meerrettichwurzeln eine blaue Farbe annimmt. Im Jahre 1855 berichtete SCHÖNBEIN (60) von einer Substanz, die in der Lage ist, die Oxydation einiger organischer Verbindungen mit Wasserstoffperoxid zu katalysieren. Diese Substanz beschrieb er als in Pflanzen und Tieren vorkommend.

Der Name Peroxidase taucht zum ersten Mal im Jahre 1898 bei LINOSSIER (42) auf, der eine oxidasefreie Präparation der Peroxidase aus Eiter herstellte. BACH und CHODAT (6) fanden die weite Verbreitung der Peroxidase in Pflanzen und zeigten, daß dieselbe aus dem Meerrettich frei von Oxidase, Catalase und proteolytischen Enzymen hergestellt werden kann. Sie zeigten weiterhin eine Anzahl von Stoffen auf, die unter Mit Hilfe von Peroxidase durch H_2O_2 oxydiert werden, unter anderem Pyrogallol, Gallussäure und einige aromatische Amine. Die erhaltenen, meist gefärbten Oxydationsprodukte wurden nicht isoliert und es wurden auch keine Aussagen über einen möglichen Reaktionsmechanismus gemacht. Lediglich die Hemmung von Peroxidase durch einen Überschuß von Wasserstoffperoxid wurde beobachtet.

Vornehmlich WILLSTÄTTER (71) beschäftigte sich in den folgenden Jahren mit der Reinigung und Aktivitätsbestimmung der Peroxidase und definierte aus der Beobachtung heraus, daß Pyrogallol mit Hilfe von Peroxidase/ H_2O_2 zu Purpurogallin oxydiert wird, die Purpurogallinzahl, die auch heute noch neben anderen Methoden, zur Aktivitätsbestimmung des Fermentes benutzt wird.

KEILIN und MANN (35) wiesen schließlich nach, daß die Peroxidase eine Hämatinverbindung ist, und THEORELL (67) zeigte durch Spaltung und Resynthese, daß das Ferment in ein Protein und ein Protohämin gespalten werden kann.

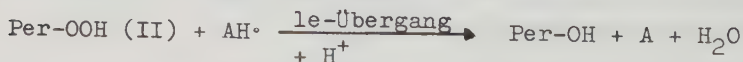
Man weiß heute, daß Meerrettichperoxidase zusammengesetzt ist aus Protohämatin IX und einem farblosen Apoenzym, einem Glukoprotein, welches seinerseits aus etwa 16 verschiedenen

Aminosäuren, unter anderem Cystein und Methionin, besteht. Der Zuckeranteil liegt wahrscheinlich als Uronsäure vor. Das Protohämatin besteht aus dem Protoporphyrin IX und Fe^{3+} , welches 6 koordinative Bindungen besitzt, von denen 4 durch die einsamen Elektronenpaare der Porphyrinheteroatome besetzt sind. Die fünfte Bindung ist durch das Apoenzym besetzt, an die sechste können sich verschiedene Liganden anlagern. Einer der möglichen Liganden ist das Wasserstoffperoxid, welches mit der Peroxidase verschiedene, gefärbte Verbindungen eingehen kann, die besonders von CHANCE (18), THEORELL und EHRENBURG (67) und KEILIN und MANN (35) beschrieben worden sind:

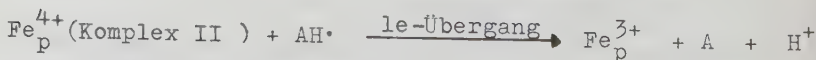
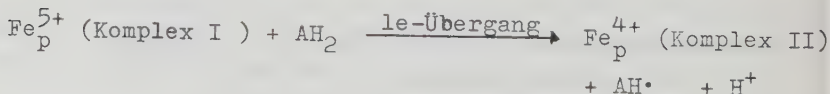
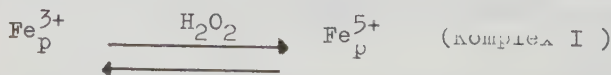


Per-OH = Peroxidase; Per-OOH = Peroxidase/ H_2O_2 - Komplexe
 AH_2 = Wasserstoffdonator

Die Verbindung II zerfällt in Gegenwart des Wasserstoffdonators :



Wie GEORGE (25) postuliert, genügt das von Chance gegebene Schema nicht in allen Fällen zur Erklärung einer Reaktion. Er nimmt an, daß das Porphyrin-Eisen in den Verbindungen I und II höhere Wertigkeitsstufen als 3^+ annehmen kann:



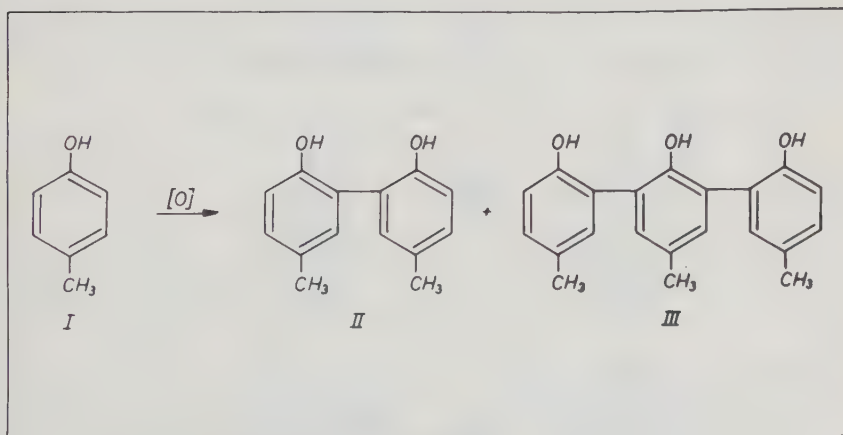
Fe_p = Protoporphyrin-Eisen der Peroxidase

Es ist noch eine Verbindung III bekannt, die mit einem gro-
Ben Überschuß an Wasserstoffperoxid entsteht (34).

SAUNDERS, HOLMES-SIEDLE und STARK (56) geben eine Zusammen-
stellung von Substraten, bei denen die Oxydationsprodukte be-
kannt sind. Es handelt sich in der Hauptsache um Phenole und
aromatische Amine. Aus der Verbindungsklasse der Heterocyclen
werden dort die Oxydation des Indols zu 2,2'-Bis(3-indolyl)-
indoxyl (30) und die Oxydation der Harnsäure zu Allantoin,
Alloxansäure und 5-Ureido-2-imidazolidon-4,5-diol-4-karbon-
säure (33) erwähnt; letztere unter Aufspaltung des Hydroxy-
pyrimidinringes.

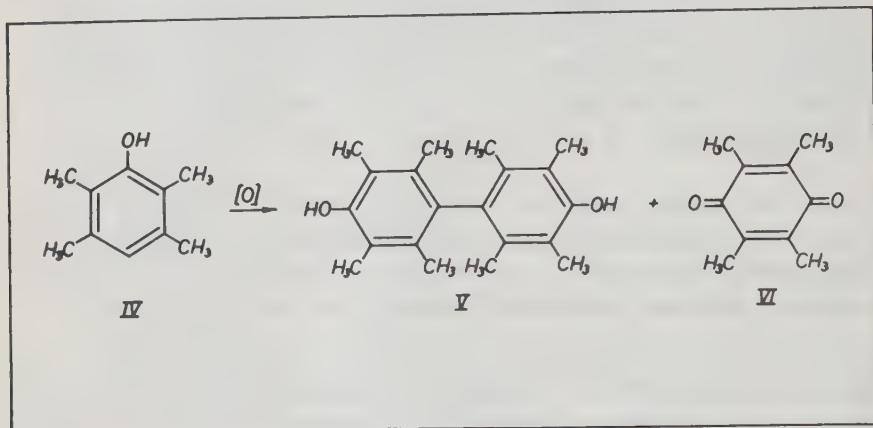
Neben Catechinen (26) sind auch Flavonoide als Substrate für
eine fermentative Oxydation mit dem System Peroxidase/H₂O₂
beschrieben worden (51) (48) (43). Die Oxydation erfolgt am
Phenylseitenring, der phenolische OH-Gruppen trägt.

Die Oxydation einfacher Phenole ist schon erwähnt worden.
WESTERFELD und LOWE (70) oxydieren p-Kresol (I) und erhalten
unter anderem 2,2'-Dihydroxy-5,5'- dimethyldiphenyl (II) und
Trihydroxytrimethylterphenyl (III).

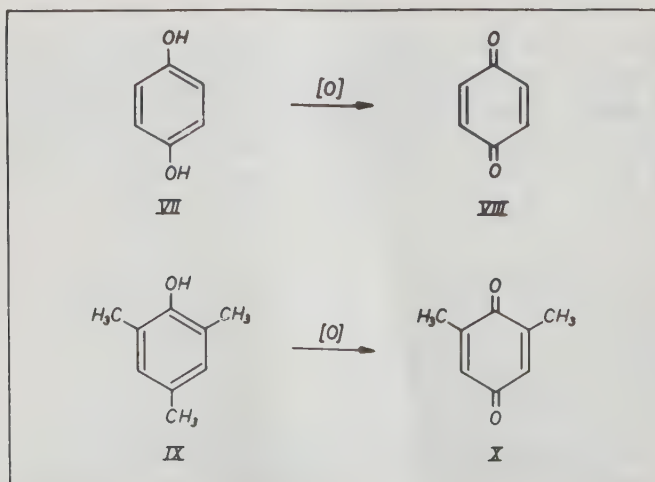


[O] = Oxydation mit H₂O₂/Peroxidase

Eine Di- und Trimerisierung hat, bei besetzter p-Stellung, in o-Stellung zur phenolischen OH-Gruppe stattgefunden. Sind die o-Stellungen durch Substituenten blockiert, wie im Durenol (IV), so tritt die Dimerisierung in p-Stellung zur OH-Gruppe ein. Es entsteht 4,4'-Dihydroxy-2,3,5,6,2',3',5',6'-octamethyldiphenyl (V) und Durochinon (VI) (14):



Hydrochinon (VII) wird zu p-Benzochinon (VIII) oxydiert und Mesityl (IX) u.a. zu 2,6-Dimethylbenzochinon (X) (14):



In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob sich Parallelen zu den oben beschriebenen Arbeiten finden lassen, wenn als Substrate Pyridinole und Pyridindiole eingesetzt werden.

Pyridin zählt zu den π - Elektronenmangelsystemen, in dem durch den elektronenziehenden Einfluß des Heteroatoms alle Kohlenstoffatome mehr oder weniger positiviert sind (1) (7). Trägt die Stammverbindung Hydroxylsubstituenten, so nimmt der π - Elektronenmangel ab.

Beim Pyridin sind, im Gegensatz zum Benzol, drei isomere Monohydroxyderivate möglich, die sich in ihren Eigenschaften zum Teil erheblich voneinander unterscheiden.

Die Unterschiede zeigen sich auch in der Acidität:

Die p_{KS} -Werte der Pyridinole betragen (4) (46) :

2-Pyridinol 11,62

3-Pyridinol 8,72

4-Pyridinol 11,09 gemessen in wässriger

Lösung bei 20°.

Im Vergleich dazu die p_{KS} -Werte einiger Pyridindiole und Phenole, ebenfalls in wässriger Lösung gemessen:

2,4-Pyridindiol 6,5 (5) bei 20°

13

2,5-Pyridindiol 8,51 (3) bei 20°

Phenol 9,98 (4) bei 20°

Hydrochinon 9,91 bei 18,7°

11,43 (8) bei 19,6°

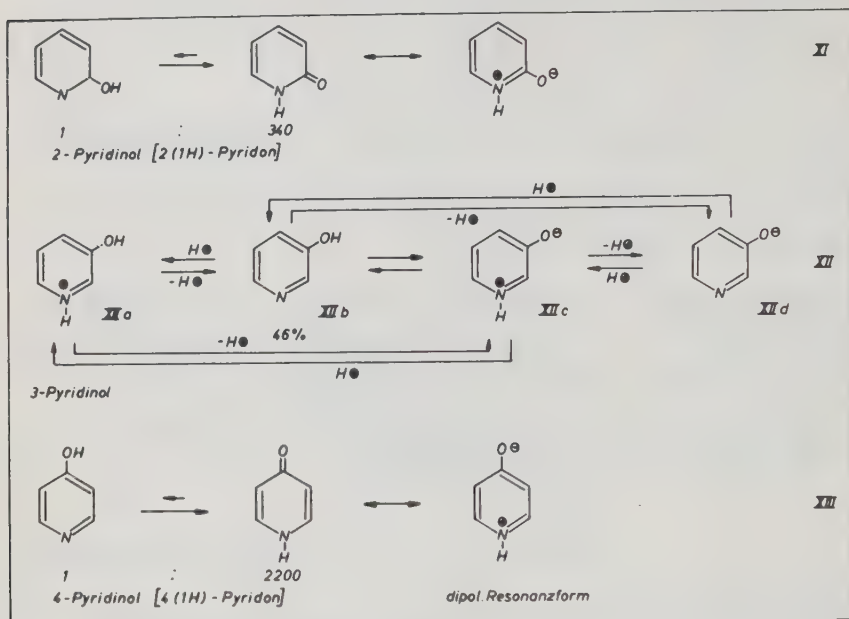
p-Kresol 10,26 (12) bei 25°

3-Pyridinol ist damit stärker sauer als Phenol, ebenso die angegebenen Pyridindiole, was aus dem ring-positivierenden Einfluß des Heteroatoms leicht abzuleiten ist.

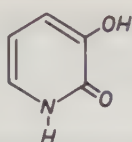
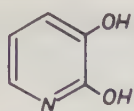
Wie aus UV- und IR-Spektren sowie Dipolmessungen hervorgeht, liegen das 2- und 4-Pyridinol überwiegend in der Pyridonform vor. Dieses bedingt auch den nur sehr schwach sauren Charakter dieser Verbindungen.

In der vorliegenden Arbeit werden folgende Hydroxyderivate des Pyridins untersucht:

2-Pyridinol (XI), 3-Pyridinol (XII), 4-Pyridinol (XIII),



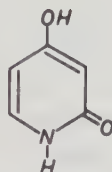
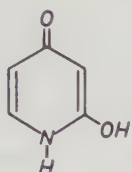
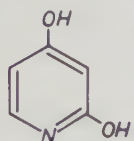
2,3-Pyridindiol (XIV), 2,4-Pyridindiol (XV), 2,5-Pyridindiol (XVI), 2,6-Pyridindiol (XVII), 3,4-Pyridindiol (XVIII), 3,5-Pyridindiol (IXX).



XIV

2,3-Pyridindiol

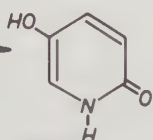
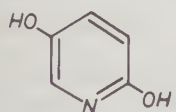
[3-Hydroxy-2(1H)-Pyridon]



XV

2,4-Pyridindiol

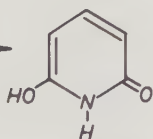
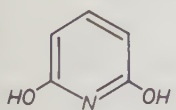
[4-Hydroxy-2(1H)-Pyridon]



XVI

2,5-Pyridindiol

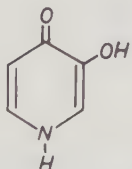
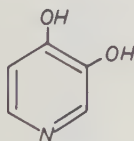
[5-Hydroxy-2(1H)-Pyridon]



XVII

2,6-Pyridindiol

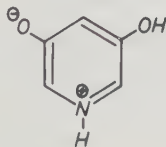
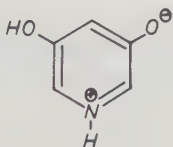
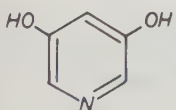
[6-Hydroxy-2(1H)-Pyridon]



XVIII

3,4-Pyridindiol

[3-Hydroxy-4(1H)-Pyridon]



IX

3,5-Pyridindiol

Im folgenden werden alle Hydroxyderivate ohne Rücksicht auf die Gleichgewichtslage als Pyridinole und Pyridindiole bezeichnet.

Es wird erwartet, daß zumindest die Pyridinderivate mit der phenolischen Hydroxylgruppe in β -Stellung wegen des phenolischen Charakters eine Reaktion mit dem System Peroxidase/ H_2O_2 zeigen und Produkte entstehen, die in das Schema der bereits bekannten Reaktionsprodukte von Phenolen passen.

Da bei der fermentativen Oxydation in einigen Fällen auch Chinone isoliert (56) oder als Zwischenprodukte nachgewiesen werden konnten (22), wird besonders nach Pyridinchinonen geforscht, die bisher noch nicht dargestellt werden konnten.

II ALLGEMEINER TEIL

II,1 Untersuchungen an Pyridinolen

II,1,1 Die Absorptionsspektren der Pyridinole im Bereich von 220-350 nm

Das Absorptionsspektrum des Pyridins ist dem Spektrum des Benzols sehr ähnlich. Es besitzt 3 Absorptionsbanden bei 175, 200 und 256 nm, deren Intensität in der genannten Reihenfolge abnimmt und die den $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergängen zugeordnet werden. Die Vibrationsstruktur der Spektren geht mit der Substitution der Stammverbindungen verloren und wäre auch, da im polaren Lösungsmittel Wasser gemessen wird, nicht mehr zu beobachten.

Durch die Einführung von auxochromen Gruppen, z.B. der OH-Gruppe, werden die Banden bathochrom verschoben, so daß eine zweite Bande im angegebenen Bereich erscheint.

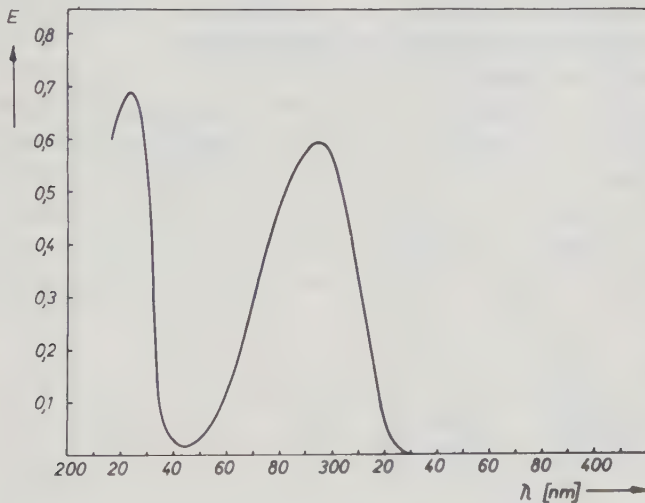


Abb. 1: Absorptionsspektrum des 2-Pyridinols (XI), 10^{-4} molar, in wässrigen Pufferlösungen p_H^3 , p_H^5 und p_H^7

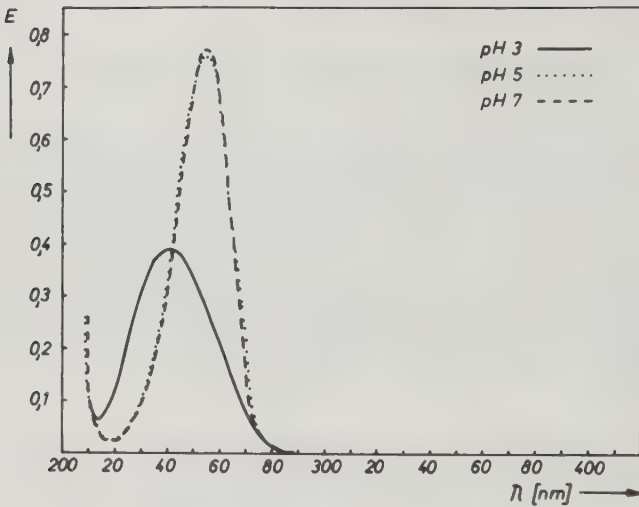


Abb. 2: Absorptionsspektren des 4-Pyridinols (XIII) $5 \cdot 10^{-5}$ molar, in wässrigen Pufferlösungen

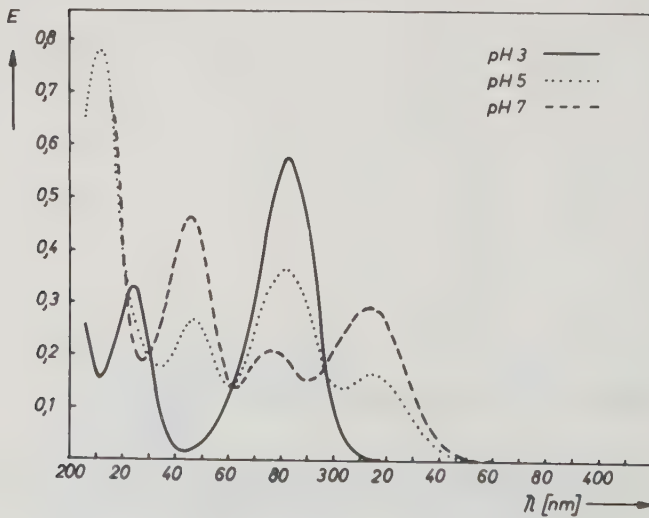


Abb. 3: Absorptionsspektren des 3-Pyridinols (XII) 10^{-4} molar, in wässrigen Pufferlösungen

Das Spektrum des 2-Pyridinols (XI) (Abb.1) ändert sich im wesentlichen nicht in saurer und alkalischer Lösung, was auf ein Überwiegen der Pyridonform hindeutet (61).

Beim 4-Pyridinol (XIII) (Abb.2) wird eine hypsochrome Verschiebung der Bande sowohl in saurer als auch in alkalischer Lösung beobachtet, was BERSON (11) mit dem höheren Energiegehalt der dipolaren Resonanzform des 4-Pyridinols gegenüber dem 2-Pyridinol erklärt.

Das 3-Pyridinol (XII) (Abb.3) zeigt in saurer Lösung (p_H^3) eine starke Bande I bei 282 nm und eine schwächere Bande II bei 224 nm. Bei p_H^5 geht die Intensität der Bande I zurück und 3 neue Banden bei 314 nm (III), 246 nm (IV) und 212 nm (V) sind zu beobachten. Bei p_H^7 sinkt die Intensität der Bande I weiter, während die Intensität der Banden III und IV weiter zunimmt. Es ist also eine starke Abhängigkeit des Kurvenverlaufs vom p_H -Wert der wässrigen Lösung vorhanden.

Nach Arbeiten von SPECKER und GAWROSCH (61) kann die starke Bande I bei 282 nm auf die in saurer Lösung erfolgende Quaternisierung des Stickstoffs zurückgeführt werden. Mit abnehmend saurer Lösung verliert die Bande an Intensität. In neutraler Lösung liegt das 3-Pyridinol in einem Gemisch von undissoziiertem Pyridinol (XIIf) und Zwitterion (XIIfc) vor. Die Banden II - IV können nicht mit Sicherheit bestimmten Strukturen zugeordnet werden.

II,1,2 Versuche zur Oxydierbarkeit der Pyridinole mit dem System Peroxidase/H₂O₂

II,1,2,1 Spektrophotometrisches Verfahren

Die wohl einfachste Möglichkeit eine Aussage zu erlangen, ob die Pyridinole eine chemische Veränderung durch das System Peroxidase/H₂O₂ erfahren, ist die spektralphotometrische Messung der Absorptionskurven und die Verfolgung des Kurvenverlaufs bei der Oxydation. Dabei soll eine Abnahme der Extinktion in den Maxima oder eine Verschiebung der Maxima ein Maßstab für eine Veränderung sein.

Die Messungen wurden bei drei verschiedenen p_H-Werten durchgeführt, und zwar bei p_H3, p_H5 und p_H7. Der niedrige p_H-Wert wurde als untere Grenze gewählt, weil im stärker sauren Bereich eine zunehmende Inaktivierung des Fermentes einsetzt (45), was auch aus den eigenen Messungen deutlich hervorgeht.

Der p_H7 wurde als obere Grenze gewählt, weil im Alkalischen stark mit einer Autoxydation der Substrate zu rechnen ist. Der zwischen beiden p_H-Werten liegende p_H5 wurde gewählt, weil das Aktivitätsoptimum der Peroxidase für viele Reaktionen in diesem Gebiet liegt. So werden z.B. Kresol, Guajakol und Hydrochinon im p_H-Bereich von 4,8 bis 5,2 oxydiert (72) (69).

Zum genauen Einhalten der p_H-Werte wurden die Reaktionen in Pufferlösungen durchgeführt.

Der günstigste Bereich für die spektralphotometrischen Messungen ergab sich für 10⁻⁴ (für einige Messungen 5.10⁻⁵) molare Lösungen der Pyridinole.

Die Reaktionen wurden in 100 ml Meßkolben durchgeführt.

Vor den Oxydationsversuchen mit dem Ferment mußte geklärt werden, ob die Pyridinole unter den Versuchsbedingungen stabil gegen Luftsauerstoff sind oder ob sie schon Veränderungen mit den einzelnen Reaktionspartnern erleiden.

Es zeigten die Lösungen der Pyridinole in Puffer mit Peroxidase (lmg) einerseits und Lösungen der Pyridinole in Puffer

mit 100 Oxydationsäquivalenten H_2O_2 (s.S.14) andererseits in der Reaktionszeit von 24 Stunden keinerlei Veränderungen des Absorptionsspektrums.

Folgende Versuche wurden den Vorversuchen angeschlossen:

Die Extinktionen folgender Lösungen wurden vor der Fermentzugabe und nach 24 Stunden spektrophotometrisch in den Maxima und Minima gemessen:

0,951 mg 2-Pyridinol ($= 10^{-5}$ Mol), 10 ml 0,01 N- H_2O_2 -Lösung ($= 10$ Oxydationsäquivalente), 0,1 ml Peroxidaselösung ($= 0,1$ mg Fermentpräparation) und 20 ml Pufferstammlösung wurden in einem Meßkolben mit Wasser zu 100 ml gelöst.

0,951 mg 3-Pyridinol wurden ebenso wie das 2-Pyridinol gelöst.

0,475 mg 4-Pyridinol ($= 5 \cdot 10^{-6}$ Mol), 5 ml 0,01 N- H_2O_2 -Lösung ($= 10$ Oxydationsäquivalente), 0,1 ml Peroxidaselösung ($= 0,1$ mg Fermentpräparation) und 20 ml Pufferstammlösung wurden in einem Meßkolben mit Wasser zu 100 ml gelöst.

Die Tabellen I, II und III geben die gemessenen Werte wieder:

	$E_{\text{Max.I}}$ 294 nm	$E_{\text{Max.II}}$ 224 nm	$E_{\text{Min.}}$ 244 nm
Puffer p_H^3			
Start	0,586	0,684	0,012
24 Stunden	0,590	0,686	0,013
Puffer p_H^5			
Start	0,592	0,690	0,016
24 Stunden	0,586	0,685	0,013
Puffer p_H^7			
Start	0,585	0,680	0,018
24 Stunden	0,586	0,684	0,019

Tabelle I Versuchsansätze mit 2-Pyridinol (XI)

	$E_{\text{Max.}}$		$E_{\text{Min.}}$	
	254 nm	240 nm	218 nm	214 nm
Puffer p_{H}^3				
Start	----	0,391	----	0,062
24 Stunden	----	0,388	----	0,059
Puffer p_{H}^5				
Start	0,755	----	0,016	----
24 Stunden	0,758	----	0,022	----
Puffer p_{H}^7				
Start	0,773	----	0,020	----
24 Stunden	0,777	----	0,023	----

Tabelle III Versuchsansätze mit 4-Pyridinol (XIII)

Aus den Meßergebnissen ist zu sehen, daß sich die Extinktionen in den Maxima und Minima über einen Zeitraum von 24 Stunden nicht wesentlich verändert haben. Diese Beobachtung gilt sowohl für die Blindversuche als auch für die Fermentansätze.

Eine Wiederholung der beschriebenen Versuche mit der 10fachen Menge Wasserstoffperoxid einerseits und 1 ml Peroxidase-lösung (= 1 mg Peroxidase) andererseits, führte zu den gleichen Ergebnissen.

	E Max.						E Min.				
	314 nm	282 nm	276 nm	246 nm	224 nm	302 nm	290 nm	263 nm	260 nm	244 nm	
Puffer p_{H^3}											
Start	---	0,573	---	---	0,328	---	---	---	---	0,020	
24 Stunden	---	0,570	---	---	0,331	---	---	---	---	0,020	
Puffer p_{H^5}											
Start	0,165	0,367	---	0,266	---	0,143	---	---	0,142	---	
4 Stunden	0,166	0,366	---	0,267	---	0,144	---	---	0,145	---	
Puffer p_{H^7}											
Start	0,288	---	0,204	0,458	---	---	0,155	0,133	---	---	
24 Stunden	0,285	---	0,205	0,451	---	---	0,151	0,137	---	---	

Tabelle II Versuchsansätze mit 3-Pyridinol (XII)

II,1,2,2 Chromatographisches Verfahren

Zur Unterstützung der bei dem spektrophotometrischen Verfahren erhaltenen Ergebnisse wurde ein chromatographisches Verfahren angeschlossen, um auf diesem Wege auftretende Reaktionsprodukte zu erfassen. Dazu wurden folgende Reaktionsansätze gemacht:

Startpkt. 1	Puffer	pH ³	+ 4,75 mg	2-Pyridinol		
" 2	"	pH ⁵	+ 4,75 mg	3-Pyridinol		
" 3	"	pH ⁷	+ 4,75 mg	4-Pyridinol		
" 4	"	pH ³	} + 10 mg + 500 Oxval			
" 5	"	pH ⁵				
" 6	"	pH ⁷			Peroxidase H ₂ O ₂	
" 7	"	pH ³	} + 4,75 mg			
" 8	"	pH ⁵				
" 9	"	pH ⁷			2-Pyridinol	
" 10	"	pH ³	} + 4,75 mg			
" 11	"	pH ⁵				
" 12	"	pH ⁷			3-Pyridinol	
" 13	"	pH ³	} + 4,75 mg			
" 14	"	pH ⁵				
" 15	"	pH ⁷			4-Pyridinol	
" 16	"	pH ³				
" 17	"	pH ⁵				
" 18	"	pH ⁷				

Die 100 ml Ansätze wurden nach 24stündiger Reaktionszeit durch Lyophilisation getrocknet und der Rückstand mit 2 ml Wasser aufgenommen. Von dieser Lösung wurden 0,02 ml pro Startpunkt auf eine Kieselgel GF₂₅₄ Platte aufgetragen und in dem Gemisch Dioxan-Methanol 4:1 (v/v) aufsteigend chromatographiert. Abbildung 4 zeigt die mit FeCl₃-Lösung angesprühten Chromatogramme.

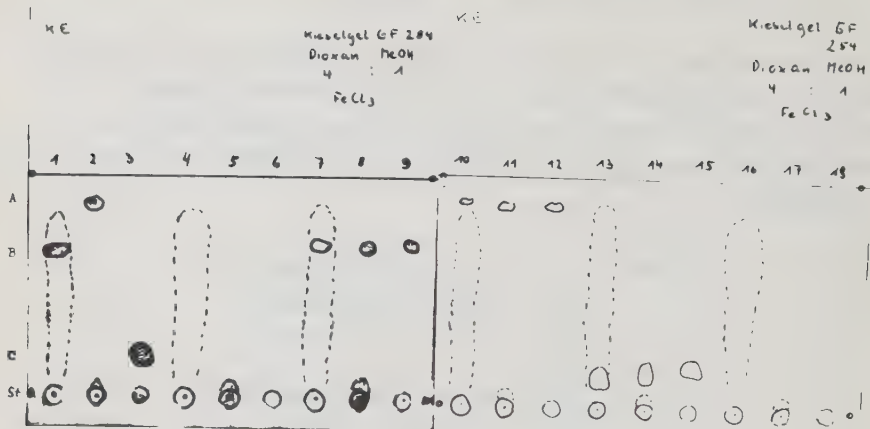


Abb.4: Chromatographische Untersuchung der auf Seite angegebenen Versuchsansätze auf Oxydierbarkeit von Pyridinolen mit dem System Peroxidase/ H_2O_2 nach 24stündiger Reaktionszeit und schonender Aufarbeitung. A: 3-Pyridinol B: 2-Pyridinol C: 4-Pyridinol Startpunkte : Puffer pH^3 , pH^5 und pH^7 Ziehender Fleck: Puffer pH^3

Sowohl aus den Ergebnissen der spektrophotometrischen Messungen, bei denen keine Extinktionsänderung in den Maxima und Minima über 24 Stunden zu beobachten war, als auch der chromatographischen Untersuchung der Reaktionsansätze nach 24 Stunden und schonender Aufarbeitung, bei der neben den Ausgangsstoffen das Auftreten neuer Produkte nicht zu beobachten war, läßt sich aussagen, daß die Pyridinole unter den angegebenen Bedingungen nicht mit dem System Peroxidase/ H_2O_2 reagieren.

Auf die Möglichkeit der Inhibition der Peroxidase durch die Pyridinole selbst wird in der Diskussion näher eingegangen.

II,2 Untersuchungen an Pyridindiolen

II,2,1 Die Absorptionsspektren der Pyridindiole im Bereich von 220-350 nm

Durch Einführung einer weiteren Hydroxylgruppe in die Pyridindiole werden deren Spektren nicht wesentlich verändert. Die OH-Gruppe als auxochrome Gruppe bedingt eine leichte bathochrome Verschiebung der Maxima. Dadurch gelangen die kurzwelligen UV-Maxima in einen gut meßbaren Bereich.

Eine Abhängigkeit der Absorptionskurven vom p_H -Wert zwischen p_H^3 und p_H^7 ist beim 2,3-Pyridindiol (Abb. 5), 2,4-Pyridindiol (Abb. 6) und 2,5-Pyridindiol (Abb. 7) nicht zu beobachten, es sei denn beim 2,4-Pyridindiol eine Intensitätsabnahme der Bande bei 274 nm bei p_H^3 und eine äußerst schwache hypsochrome Verschiebung der gleichen Bande um 2 nm bei p_H^7 . Das langwellige Maximum des 2,5-Pyridindiols wird bei p_H^3 ebenfalls um 2 nm hypsochrom verschoben.

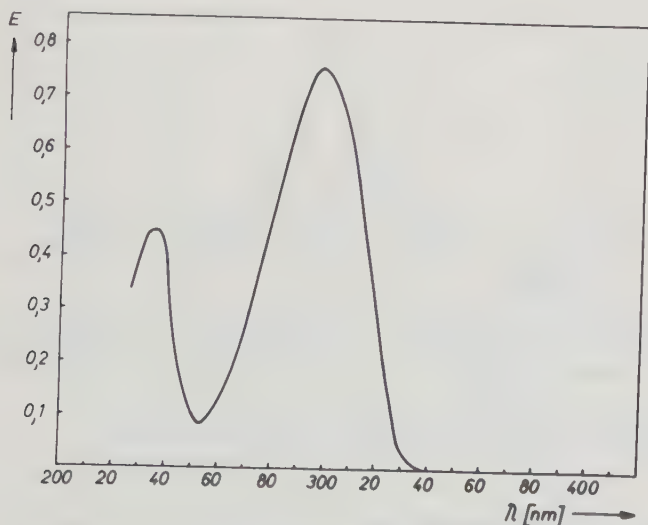


Abb.5: Absorptionsspektrum des 2,3-Pyridindiols (XIV), 10^{-4} molar, in wässrigen Pufferlösungen p_H^3 , p_H^5 und p_H^7

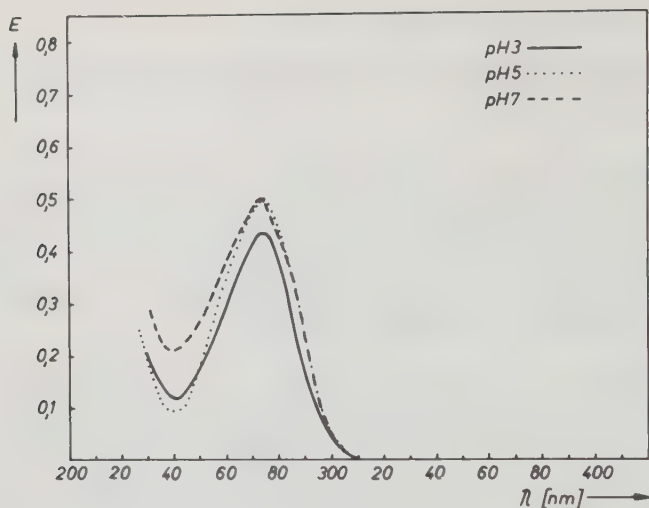


Abb.6: Absorptionsspektren des 2,4-Pyridindiols (XV), 10^{-4} molar, in wässrigen Pufferlösungen

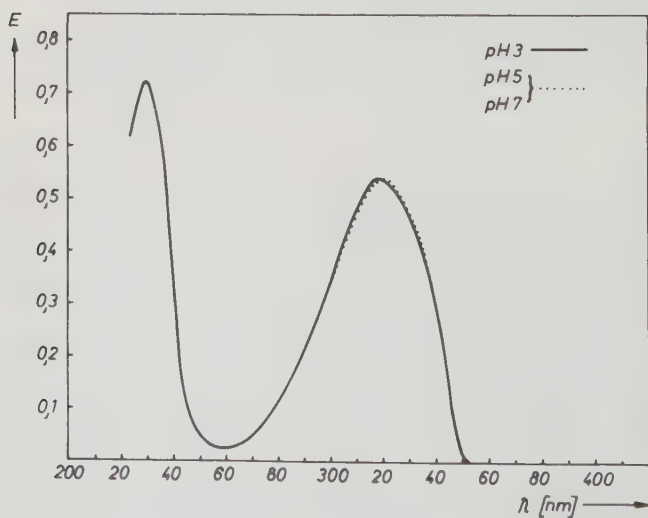


Abb.7: Absorptionsspektren des 2,5-Pyridindiols (XVI), 10^{-4} molar, in wässrigen Pufferlösungen

Beim 2,6-Pyridindiol verschiebt sich das langwellige Maximum unter Intensitätssteigerung vom sauren zum neutralen

Bereich um etwa 10 nm, wobei gleichzeitig bei p_{H5} und p_{H7} ein neues kurzwelliges Maximum erscheint, welches sich ebenfalls zum Neutralen hin bathochrom verschiebt (Abb. 8). Der Kurvenverlauf des 3,4-Pyridindiolis ist bei p_{H5} und p_{H7} der gleiche, während im sauren Bereich (p_{H3}) das langwellige Maximum um etwa 4 nm hypsochrom unter Intensitätsminderung verschoben ist (Abb. 9). Das 3,5-Pyridindiol zeigt sich im Verlauf seiner Absorptionskurve ebenfalls abhängig vom p_{H} -Wert. Während bei p_{H7} ein Maximum bei 312 nm und eine Schulter bei 270 nm zu beobachten ist, bildet sich bei p_{H5} ein Maximum bei 272 nm aus und das Maximum bei 312 nm erscheint nur noch als Schulter. Bei p_{H3} findet man nur das Maximum bei 272 nm stark ausgeprägt (Abb. 10).

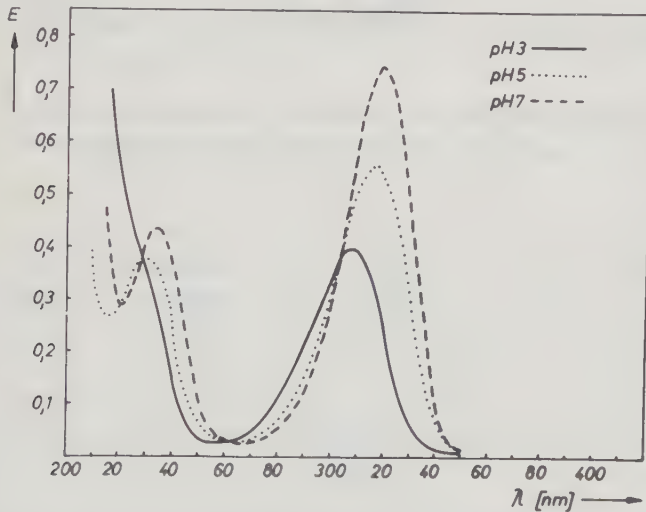


Abb.8: Absorptionsspektren des 2,6-Pyridindiolis (XVII), $5 \cdot 10^{-5}$ molar, in wässrigen Pufferlösungen

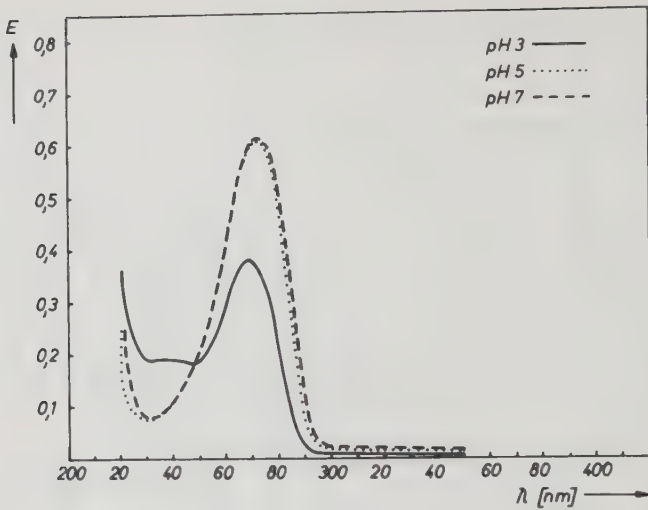


Abb.9: Absorptionsspektren des 3,4-Pyridindiolis (XVIII), $5 \cdot 10^{-5}$ molar, in wässrigen Pufferlösungen

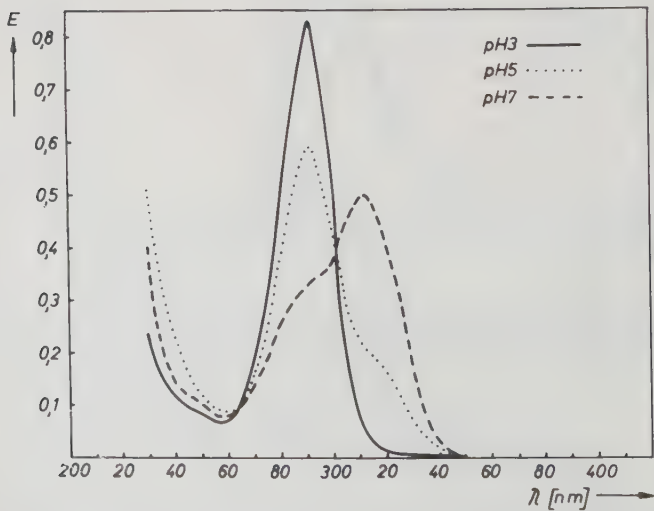


Abb.10: Absorptionsspektren des 3,5-Pyridindiolis (IX), 10^{-4} molar, in wässrigen Pufferlösungen

II,2,2 Versuche zur Oxydierbarkeit der Pyridindiole mit dem System Peroxidase/ H_2O_2

Die Durchführung der Versuche wurde wie bei den Pyridinolen gestaltet. Auch hier wurde bei p_{H}^3 , p_{H}^5 und p_{H}^7 spektrophotometrisch untersucht, ob eine Veränderung der Extinktion in einem Maximum zu beobachten war.

Im Vorversuch wurden die Pyridindiole ebenfalls spektrophotometrisch auf ihre Stabilität in den drei Pufferlösungen und gegen Wasserstoffperoxid ohne Ferment untersucht. Die Versuchsansätze wurden auch hier in 100 ml Meßkolben bereitet und jeweils am Anfang und in geeigneten Zeitintervallen auf Veränderungen der Absorptionsspektren untersucht. Als günstigste Konzentrationen erwiesen sich solche von 10^{-4} bzw. $5 \cdot 10^{-5}$ Mol/Liter.

Im folgenden sollen die Ergebnisse der Oxydationsversuche mit den Pyridindiolen wiedergegeben werden.

II,2,2,1

Das 2,3-Pyridindiol, dessen Spektrum wie Abb. 5 zeigt in den angegebenen Grenzen p_{H} unabhängig ist, wurde in 10^{-4} molarer, wässriger Lösung im Maximum bei 297 nm gemessen. Dabei zeigte sich, daß die Extinktion im Maximum sowie der gesamte Kurvenverlauf bei allen drei p_{H} -Werten über 48 Stunden nicht verändert wurde. Die gleichen Ergebnisse wurden auch auf Zusatz von 100 Oxval H_2O_2 erzielt.

Setzte man den Versuchen neben Wasserstoffperoxid 0,1 mg Peroxidase zu, so konnte man bei p_{H}^5 und p_{H}^7 starke Abnahme der Extinktion feststellen, während bei p_{H}^3 und Wasserstoffperoxidkonzentrationen von 1-8 Oxval keine Veränderungen auftraten. Bei p_{H}^5 war die Extinktionsabnahme mit 1-8 Oxval H_2O_2 nach etwa 6 Stunden abgeschlossen und führte unabhängig von der H_2O_2 -Konzentration zum gleichen Endwert.

Bei p_{H}^7 war die Extinktionsabnahme erst bei 5 Oxval vollständig, wonach eine weitere Zugabe von Wasserstoffperoxid ohne Einfluß blieb (Abb. 11).

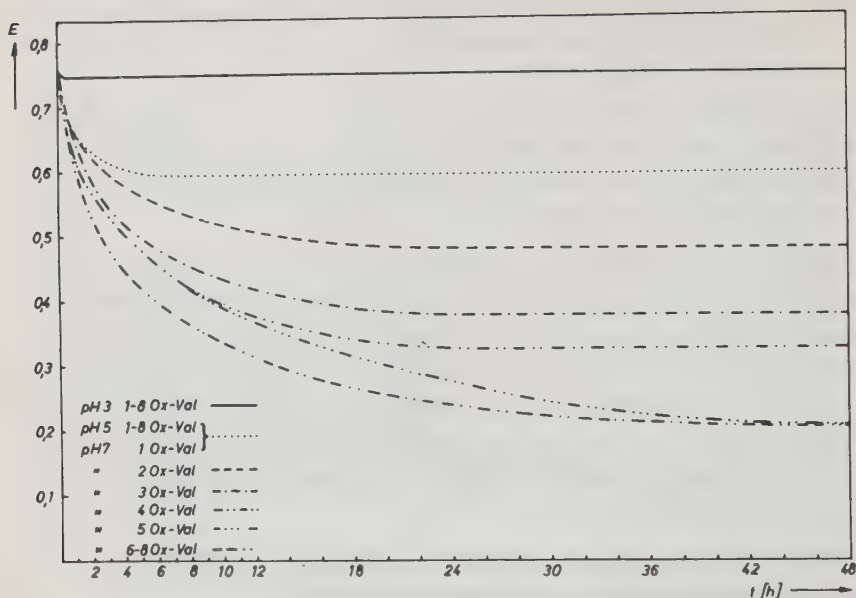


Abb. 11: Extinktionsabnahme im Maximum 297 nm bei der Oxydation von 2,3-Pyridindiol (XIV), 10^{-4} molar, mit steigenden H_2O_2 -Konzentrationen und 0,1 mg Peroxidase in wässrigen Pufferlösungen p_H^3 , p_H^5 und p_H^7 in Abhängigkeit von der Zeit

Abb. 12 zeigt das Spektrum des 2,3-Pyridindiods und das Spektrum der Lösung nach beendeter Reaktion bei p_H^7 . Die Lösung bei p_H^5 färbte sich während der Reaktionszeit gelb, die Lösung bei p_H^7 zeigte eine rotviolette Farbe.

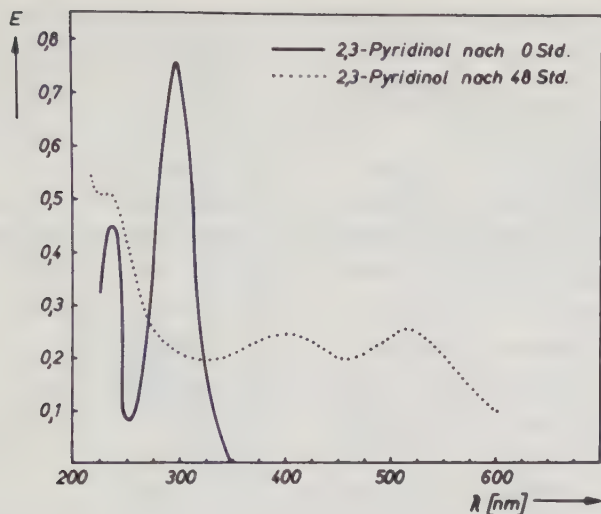


Abb.12: Absorptionskurven des 2,3-Pyridindiols (XIV), 10^{-4} molar, in wässriger Pufferlösung $p_H 7$ und der gleichen Lösung 48 Stunden nach Zusatz von 8 Oxval H_2O_2 und 0,1 mg Peroxidase

II,2,2,2

Das 2,4-Pyridindiol wurde ebenfalls in 10^{-4} molarer Lösung im Maximum bei 274 nm gemessen.

Auch hier ist keine wesentliche Abhängigkeit der Lage des Maximums vom p_H -Wert festzustellen (Abb. 6).

Die Versuchsansätze glichen denen des 2,3-Pyridindiols. Zuerst wurde die Lösung mit den Puffern allein, dann unter Zusatz von 10 Oxval H_2O_2 und schließlich außerdem unter Zugabe von 0,1 mg Peroxidase untersucht.

Dabei zeigten sich alle Lösungen in ihrem Kurvenverlauf unverändert.

Tabelle IV zeigt die Meßwerte im Maximum und Minimum der Absorptionskurve des Ansatzes mit Ferment.

	E _{Max.} 274 nm	E _{Min.} 241 nm
Puffer p _H ³		
Start	0,436	0,120
24 Stunden	0,438	0,121
Puffer p _H ⁵		
Start	0,488	0,085
24 Stunden	0,495	0,092
Puffer p _H ⁷		
Start	0,489	0,210
24 Stunden	0,490	0,209

Tabelle IV: Meßwerte im 10^{-4} molaren Lösungen von
2,4-Pyridindiol (Fermentansätze mit
10 Oxval H_2O_2 und 0,1 mg Peroxidase)

Eine Wiederholung der Versuche mit 100 Oxval H_2O_2 und 1 mg Ferment brachte keine anderen Ergebnisse.

II,2,2,3

Ein ganz anderes Ergebnis wurde bei den Oxydationsversuchen mit dem 2,5-Pyridindiol erhalten.

Schon bei der Herstellung der Substanz hatte sich gezeigt, wie empfindlich sie gegen Luftsauerstoff ist.

So war es nur bei sorgfältigem Arbeiten möglich, das 2,5-Pyridindiol farblos zu erhalten. Läßt man dem Luftsauerstoff, besonders in Lösung, ungehindert Zutritt, setzt bald eine rosa-violette Verfärbung ein.

Die Versuchsbedingungen wurden wie bei den vorangegangenen Pyridindiolen gestaltet. Trotz der Oxydationsempfindlichkeit des 2,5-Pyridindiols waren die 10^{-4} molaren Lösungen, wie die Vorversuche ergaben, bei allen drei p_H-Werten über 48 Stunden stabil.

Erst die Zugabe von Wasserstoffperoxid ließ die Extinktion im Maximum bei 320 nm absinken. Abb. 13 zeigt die Abnahme der Extinktion in Abhängigkeit von der Zeit. Während die Lösungen bei p_{H^3} und p_{H^5} noch relativ stabil bis 8 Oxval H_2O_2 sind, zeigt sich bei p_{H^7} eine deutliche Abnahme der Extinktion, welche in Abhängigkeit zur zugesetzten Wasserstoffperoxid-Menge steht. Die Extinktionsabnahme steigt mit der steigenden H_2O_2 -Konzentration.

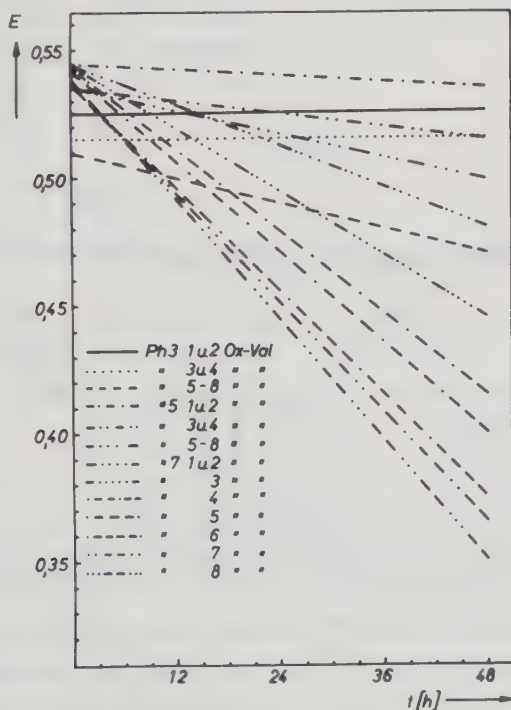


Abb.13: Extinktionsabnahme im Maximum (320 nm) nach Zusatz steigender H_2O_2 -Mengen zu 10^{-4} molaren, wässrigen Lösungen von 2,5-Pyridindiol (XVI) bei p_{H^3} , p_{H^5} und p_{H^7} in Abhängigkeit von der Zeit

Fügt man den Ansätzen außerdem 0,1 mg Peroxidase zu, so erfolgt eine rasche Reaktion. Zu dieser Annahme kommt man schon allein durch die Beobachtung einer schnellen Verfärbung der Lösung, aus der man, allerdings recht grob, auf einen Reak-

tionsverlauf schließen kann. Tabelle V gibt den Farbwechsel der Lösungen bei p_{H^5} und p_{H^7} in Abhängigkeit von der H_2O_2 -Konzentration innerhalb von 48 Stunden wieder.

p_H^5	1	5	10	20	30	60	90	2	4	24	48
	Minuten							Stunden			
1 Oxval	rot			grau	grün	grün-blau		blau		blau-schwarz ↓ blau	
2 Oxval											
3 Oxval				bor-deaux-rot		violett		bor-deaux-rot		rot ↓ rosa	
4 Oxval											
5 Oxval										oliv	
6 Oxval										rosa	
7 Oxval										orange	
8 Oxval										gelb	

p_H^7	1	5	10	20	30	60	90	2	4	24	48
	Minuten							Stunden			
1 Oxval	rot ↓ violett			rot/grün fluoresz.		grün-blau		grün	gelbgrün		
2 Oxval				rot ↓ rosa		grün	oliv	grün-gelb			
3 Oxval					rot	rot	gelbgrün			gelb	
4 Oxval					↓	orange	rosa				
5 Oxval					rosa						
6 Oxval					↓						
7 Oxval					violett	blau-grün	grün-gelb				
8 Oxval											

Tabelle V: Farbwechsel 10^{-4} molarer, wässriger Lösungen von 2,5-Pyridindiol (XVI) bei der Oxydation mit steigenden H_2O_2 -Konzentrationen und 0,1 mg Peroxidase bei p_{H^5} und p_{H^7} während 48 Stunden

Es muß danach auf die Bildung eines oder mehrerer nicht stabiler Zwischenprodukte geschlossen werden, die in Lösung bei p_{H^5} und p_{H^7} eine rote Farbe besitzen und sich bei p_{H^7} schneller in ein oder mehrere gelb gefärbte Endprodukte umwandeln.

Bei p_{H^5} wird mit niedrigen H_2O_2 -Konzentrationen (1-6 Oxval) in 48 Stunden die gelbe Endstufe nicht erreicht.

Wegen der Schnelligkeit der Reaktion im Fermentansatz wurde nicht im Spektralphotometer PMQ II der Firma Zeiss, sondern in dem selbstregistrierenden Spektrophotometer DK-1a der Firma Beckman gearbeitet.

Abb. 14 zeigt die Abnahme der Extinktion im Maximum bei 320 nm in Abhängigkeit von der Zeit. Die Extinktionsabnahme

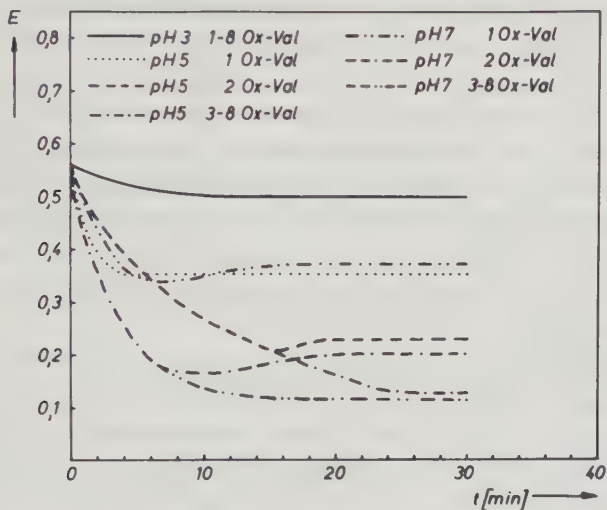


Abb.14: Extinktionsabnahme im Maximum 320 nm bei der Oxydation von 2,5-Pyridindiol (XVI), 10^{-4} molar, nach Zusatz steigender Mengen Wasserstoffperoxid und 0,1 mg Peroxidase in wässrigen Pufferlösungen bei p_H^3 , p_H^5 und p_H^7 in Abhängigkeit von der Zeit

im Maximum bei p_H^3 ist nur gering und nicht durch höhere H_2O_2 -Konzentrationen zu beeinflussen. Die Lösung bei p_H^5 erreicht die größte Extinktionsabnahme bei 3 Oxval und ist auch bei höheren H_2O_2 -Konzentrationen nicht zu verändern. Bei p_H^7 wird mit 3 Oxydationsäquivalenten die maximale Extinktionsabnahme erreicht, die auch durch höhere Konzentrationen des Oxydationsmittels zum gleichen Endwert führt. Der Extinktionsanstieg, der mit 1 und 2 Oxval bei p_H^7 und mit 2 Oxval bei p_H^5 nach etwa 8 Minuten zu beobachten ist,

läßt sich durch die Bildung von Zwischenprodukten erklären, welche die Extinktionsabnahme bei 320 nm beeinflussen. Der Endwert der Extinktionsabnahme ist nach etwa 25 Minuten erreicht. Demgegenüber kann die Reaktion des 2,5-Pyridindiols mit H_2O_2 allein (Abb. 13) vernachlässigt werden.

Daß die Reaktion mit dem Erreichen des Extinktionsendwertes bei 320 nm nicht beendet ist, zeigt die Betrachtung der Tabelle V.

Zur näheren Untersuchung der Zwischenprodukte wurde das Spektrum der rotgefärbten Lösungen bei $p_H 5$ und $p_H 7$ 10 Minuten nach Reaktionsbeginn aufgenommen. Es zeigte sich in beiden Lösungen ein Maximum bei 513 nm und eine Schulter bei etwa 542 nm.

Im Maximum bei 513 nm wurde die Extinktionsänderung über 60 Minuten verfolgt.

Die Ergebnisse sind in Abb. 15 aufgezeigt.

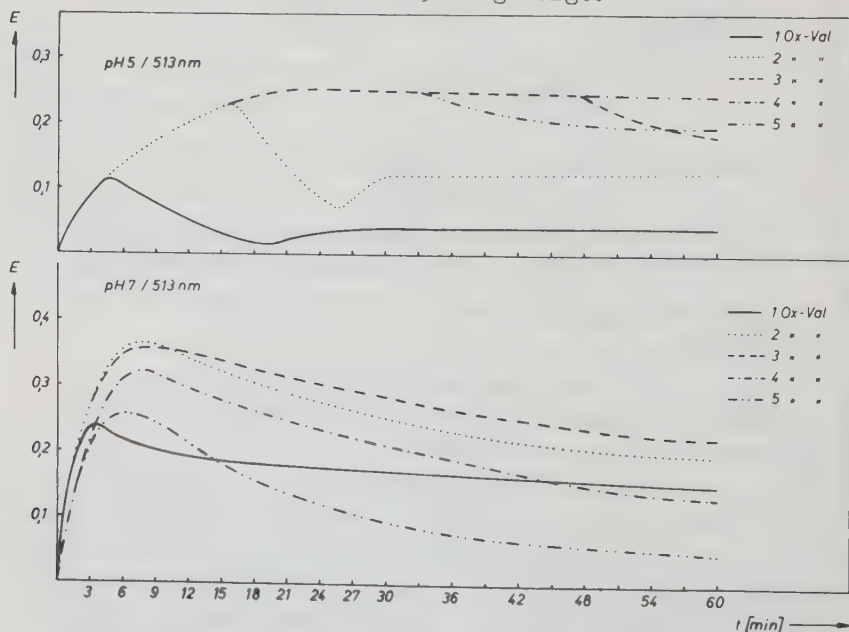


Abb.15: Extinktionsänderung im Maximum (513nm) bei der Oxydation von 2,5-Pyridindiol (XVI), 10^{-4} molar, nach Zusatz steigender Mengen Wasserstoffperoxid und 0,1 mg Peroxidase, in wässrigen Pufferlösungen bei $p_H 5$ und $p_H 7$ während 60 Minuten

Danach nimmt die Extinktion bei p_H^5 ab 3 Oxval nach etwa 24 Minuten den höchsten Wert an, was mit der maximalen Extinktionsabnahme im Maximum bei 320 nm übereinstimmt.

Mit 1 und 2 Oxval ist die Oxydation unvollständig, was offensichtlich zur Bildung eines anderen Endproduktes führt, wie die Farbänderung der Reaktionslösung anzeigt (Tabelle V), und gleichzeitig den Wiederanstieg der Extinktion erklären würde. Ein nach 25 Minuten aufgenommenes Spektrum der Lösung mit 1 Oxval ließ bei 615 nm und 385 nm neue Maxima erkennen.

Auch die Lösungen mit 3-5 Oxval verändern sich weiter, was durch den Extinktionsabfall im Maximum bei 5 Oxval nach 34 Minuten und bei 3 Oxval nach 48 Minuten deutlich wird. In der Lösung mit 4 Oxydationsäquivalenten H_2O_2 ist das Zwischenprodukt mit einem Maximum bei 513 nm am stabilsten.

Bei p_H^7 ist die Abnahme der Extinktion bei 320 nm dagegen bereits nach 15 Minuten beendet und mit 3 Oxval vollständig (Abb. 14). Dieses Ergebnis wird durch die Messungen des Extinktionsanstiegs bei 513 nm unterstützt: Die Erhöhung der Extinktion erfolgt rascher als bei p_H^5 . Der maximale Wert wird mit 2 Oxval nach 8 Minuten erreicht und sinkt dann schneller als bei p_H^5 wieder ab. Besonders die höheren H_2O_2 -Konzentrationen vermindern die Extinktion erheblich und führen sehr schnell zum Verschwinden des Maximums.

Die spektrophotometrisch ermittelten Ergebnisse lassen sich auch visuell aus Tabelle V ablesen:

Während bei p_H^5 die Farbe der roten Lösung zum Teil über 48 Stunden erhalten bleibt, geht sie bei p_H^7 schnell in eine gelbe Farbe über.

Abb. 16 zeigt die Spektren des 2,5-Pyridindiols bei p_H^7 in 10^{-4} molarer Lösung und der Reaktionslösungen nach 30 Minuten und 24 Stunden. Danach nimmt das Maximum bei 513 nm zugunsten eines neuen Maximums bei 382 nm ab (gelbe Lösung).

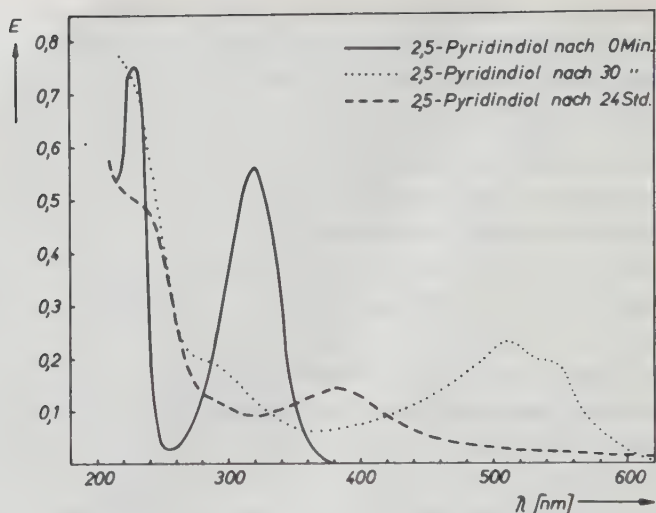


Abb. 16: Absorptionskurven des 2,5-Pyridindiol (XVI), 10^{-4} molar, in wässriger Pufferlösung bei $p_H 7$ und der gleichen Lösung 30 Minuten und 24 Stunden nach Zugabe von 4 Oxydationsäquivalenten H_2O_2 und 0,1 mg Peroxidase

II,2,2,4

Im 2,6-Pyridindiol haben wir eine Substanz vor uns, die sehr unbeständig gegenüber Luftsauerstoff und Oxydationsmittel ist. Bei der Herstellung der Substanz ist die Reinigung noch schwieriger als beim 2,5-Pyridindiol.

2,6-Pyridinol ruft bei unvorsichtigem Arbeiten an den Händen violett-braune Verfärbungen hervor und ist auch als Haarfärbemittel in Gebrauch (40).

Die spektrophotometrischen Messungen wurden mit $5 \cdot 10^{-5}$ molaren Lösungen in der schon beschriebenen Art und Weise durchgeführt.

Die Extinktionsveränderung wurde in den Maxima 320 nm ($p_H 7$) 317 nm ($p_H 5$) und 308 nm ($p_H 3$) beobachtet (Abb. 17).

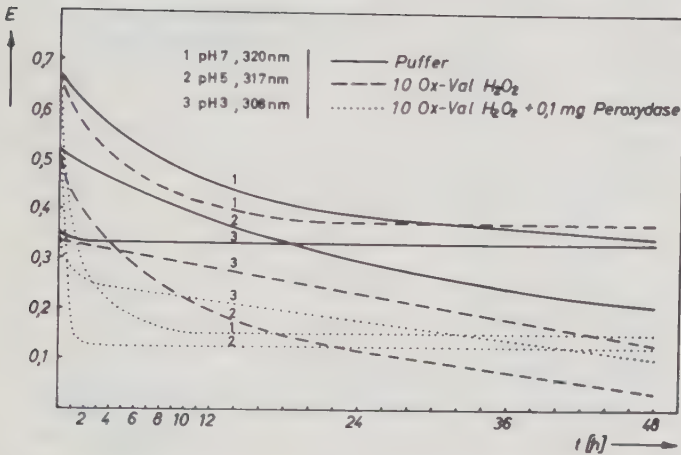


Abb. 17: Extinktionsabnahme in den angegebenen Maxima $5 \cdot 10^{-5}$ molarer Lösungen von 2,6-Pyridindiol (XVII) a) in den Pufferlösungen p_{H3} , p_{H5} und p_{H7} ohne Oxydationsmittel und Ferment, b) nach Zusatz von 10 Oxval H_2O_2 und 0,1 mg Peroxidase, in Abhängigkeit von der Zeit

Es erwartet, ist die Stabilität der Substanz in saurer Lösung am größten, kleiner in Lösung bei p_{H5} und am kleinsten bei p_{H7} . Durch Zusatz von Wasserstoffperoxid ist die Extinktionsabnahme beschleunigt, wobei die Zugabe von 5 und 10 Oxval H_2O_2 zu den gleichen Endwerten führte. Wird neben Wasserstoffperoxid noch 0,1 mg Ferment zugesetzt, so wird die Extinktionsabnahme weiter beschleunigt, wobei auch hier die gleichen Werte mit 5 und 10 Oxval bei 48 Stunden Reaktionszeit erhalten werden.

Die anfangs violett gefärbten Lösungen entfärbten sich im Laufe von 72 Stunden wieder.

Abb. 18 gibt den Kurvenverlauf von 2,6-Pyridindiol und der

Reaktionslösung nach 48 und 72 Stunden wieder. Das Maximum bei etwa 570 nm ist nach 72 Stunden nicht mehr zu beobachten.

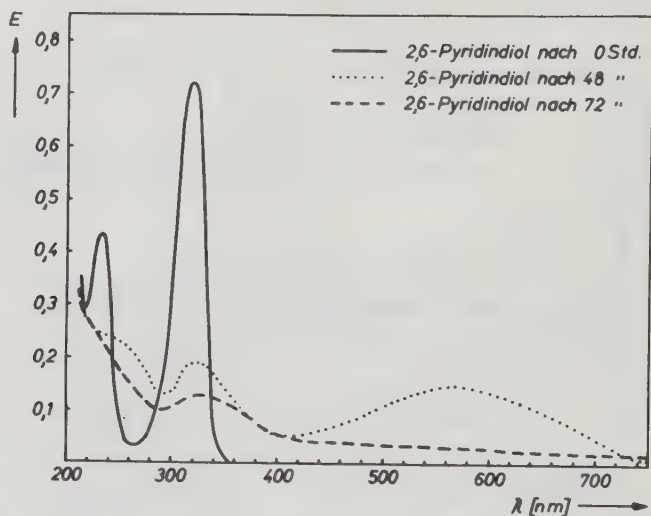


Abb.18: Absorptionskurven des 2,6-Pyridindiol (XVII), $5 \cdot 10^{-5}$ molar, in wässriger Pufferlösung bei $p_H 7$ und der gleichen Lösung 48 und 72 Stunden nach Zusatz von 10 Oxval H_2O_2 und 0,1 mg Peroxidase

II,2,2,5

3,4-Pyridindiol wurde in $5 \cdot 10^{-5}$ molarer Lösung in den Maxima bei 273 nm ($p_H 5$ und $p_H 7$) und bei 269 nm ($p_H 3$) auf Veränderung der Extinktion untersucht.

Die Spektren der Lösungen zeigten bei allen drei p_H -Werten, auch nach Zusatz von 10 Oxval H_2O_2 über 48 Stunden keine Veränderungen. Auf Zusatz von 0,1 mg Peroxidase zur Lösung mit 10 Oxval zeigten die Spektren der Lösungen bei $p_H 3$ und $p_H 5$ ebenfalls keine Veränderung, während bei $p_H 7$ im Maximum bei 273 nm eine leichte Extinktionsabnahme zu beobachten war. Setzte man den Ansätzen die 10fache Menge Ferment zu, so war bei $p_H 3$ keine Änderung, bei $p_H 5$ und $p_H 7$ jedoch eine starke, aber langsame Extinktionsabnahme in den Maxima zu bemerken, wobei die Abnahme in der neutralen Lösung größer war als bei

p_H^5 .

Eine Farbänderung der Lösungen ging mit der Extinktionsabnahme nicht einher.

Abb. 19 gibt den zeitlichen Verlauf der Extinktionsabnahme wieder, während Abb. 20 die Absorptionskurve einer $5 \cdot 10^{-5}$ molaren 3,4-Pyridindiollösung bei p_H^7 und einer Reaktionslösung nach 48 Stunden zeigt. Eine Schulter ist zwischen 300 und 320 nm angedeutet, was auch den Wiederanstieg der Extinktion bei 273 nm erklärt.

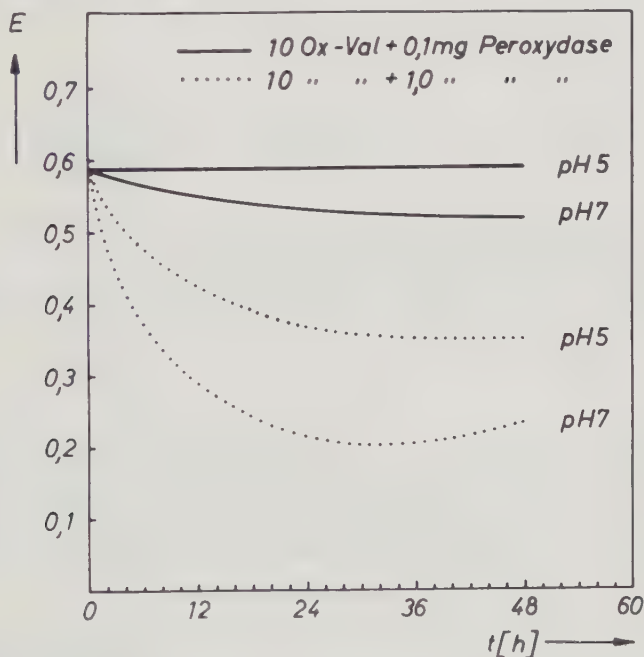


Abb. 19: Extinktionsabnahme im Maximum bei 273 nm $5 \cdot 10^{-5}$ molarer Lösungen von 3,4-Pyridindiol (XVIII) bei p_H^5 und p_H^7 mit 10 Oxydationsäquivalenten H_2O_2 und 0,1 mg bzw. 1 mg Peroxidase in Abhängigkeit von der Zeit

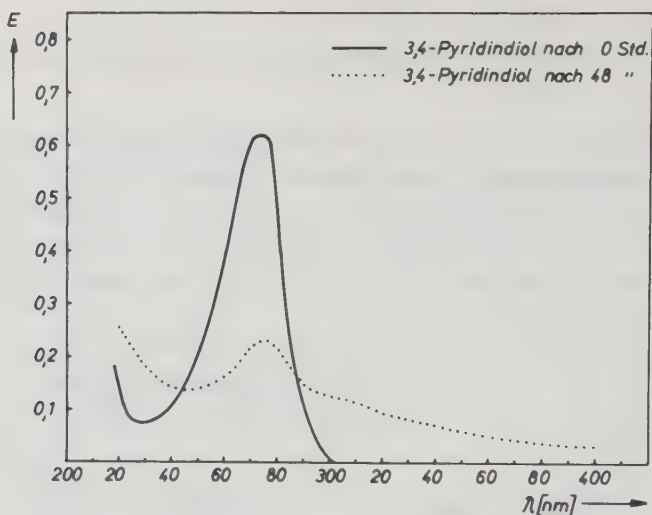


Abb.20: Absorptionskurven des 3,4-Pyridindiolis (XVIII), $5 \cdot 10^{-5}$ molar, in wässriger Pufferlösung bei $p_H 7$ und der gleichen Lösung 48 Stunden nach Zugabe von 10 Oxval H_2O_2 und 1 mg Peroxidase

II,2,2,6

3,5-Pyridindiol wurde in 10^{-4} molarer Lösung bei $p_H 3$ und $p_H 5$ im Maximum bei 292 nm und bei $p_H 7$ im Maximum bei 312 nm vermessen. Die Maxima der Spektren zeigten in den drei Pufferlösungen über 48 Stunden keine Veränderungen, auch nicht auf Zusatz von 100 Oxydationsäquivalenten H_2O_2 .

Bei Einsatz von 0,1 mg Peroxidase, 10 und 100 Oxval Wasserstoffperoxid blieb das Maximum bei $p_H 3$ unverändert, während die Lösungen bei $p_H 5$ und $p_H 7$ eine Gelbfärbung und eine schwache Extinktionsabnahme in den Maxima zeigten. Bei Zusatz von 1 mg Ferment und 10 Oxval H_2O_2 war bei $p_H 5$ eine stärkere Extinktionsabnahme im Maximum 292 zu beobachten, bei $p_H 7$ war die Erniedrigung der Extinktion ebenfalls nur gering (Abb. 21).

Das Ergebnis mit 0,1 mg Peroxidase und 100 Oxval H_2O_2 läßt an eine partielle Inhibition des Fermentes durch das Oxydationsmittel denken.

Offensichtlich ist die Reaktion bei $p_H 5$ begünstigt und eher durch höhere Fermentkonzentrationen als durch größere Oxydationsmittelmengen zu fördern.

Abb. 22 zeigt die Absorptionskurve einer 10^{-4} molaren Lösung des 3,5-Pyridindiols bei $p_H 5$ mit 10 Oxval H_2O_2 und 1 mg Ferment vor und 48 Stunden nach Reaktionsbeginn. Ein neues Maximum ist bei 398 nm zu bemerken.

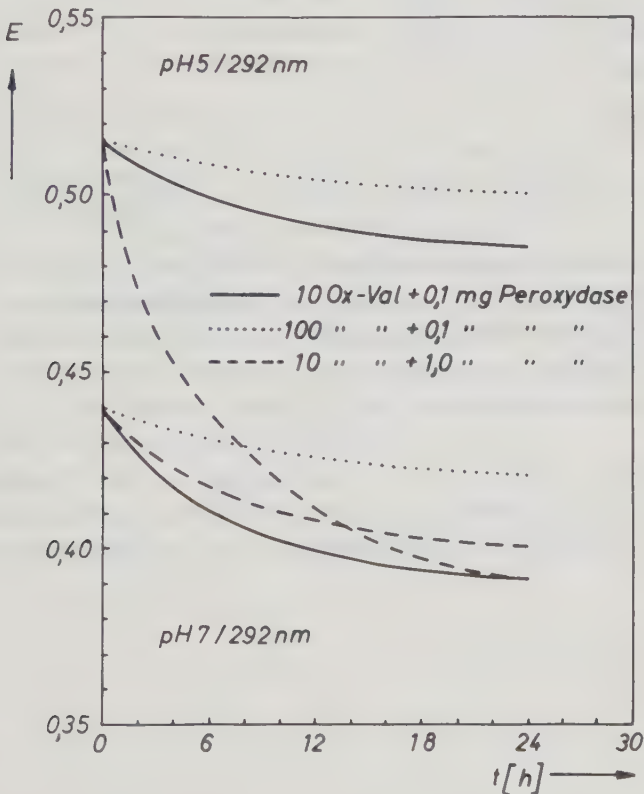


Abb.21: Extinktionsabnahme im Maximum bei 292 nm 10^{-4} molarer, wässriger Lösungen von 3,5-Pyridindiol (IXX) bei $p_H 5$ und $p_H 7$ und den angegebenen Konzentrationen von H_2O_2 und Ferment in Abhängigkeit von der Zeit

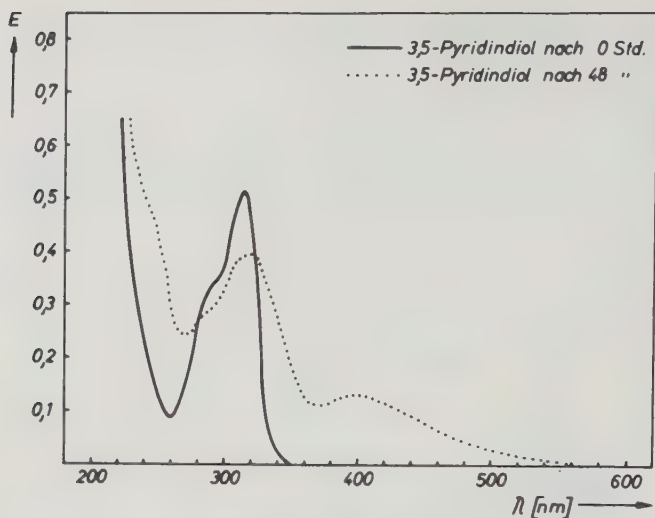


Abb.22: Absorptionskurven des 3,5-Pyridindiol (IXX), 10^{-4} molar, in wässriger Pufferlösung bei $p_H 5$ und der gleichen Lösung 48 Stunden nach Zugabe von 10 Oxydationsäquivalenten H_2O_2 und 1 mg Peroxidase

Wie schon erwähnt, sind die Ergebnisse der Untersuchungen mit dem 3,5-Pyridindiol nur mit Vorbehalt zu bewerten, da für die Reinheit der Substanz nicht garantiert werden kann.

Nach der Untersuchung der Pyridinole und Pyridindiole auf ihre Reaktivität mit dem System Peroxidase/ H_2O_2 interessieren natürlich auch die bei der fermentativ katalysierten Oxydation entstandenen Stoffe.

In den folgenden Kapiteln wird versucht ein Reaktionsprodukt zu isolieren und die Struktur aufzuklären.

Da bei der fermentativen Oxydation häufig polymere Stoffe gebildet werden, die sich nur sehr schwer isolieren und bestimmen lassen, gilt das besondere Interesse den Zwischenprodukten, wobei auch auf Pyridinchinone zu achten sein wird.

Für eingehendere Untersuchungen über die Oxydation der Pyridindiole wurde das 2,5-Pyridindiol ausgewählt.

Einmal liefert es eine gute Umsetzung mit wenig Ferment, welches bei der Isolierung von Oxydationsprodukten nur stören würde, zweitens wird hier ein Zwischenprodukt gebildet, welches sich innerhalb einer annehmbaren Zeitspanne in der Lösung - besonders bei p_{H^5} - hält (siehe Abb. 15) und drittens zeigte sich, daß der rote Farbstoff, der sich bei der Umsetzung als Zwischenprodukt bildet, mit Aethylacetat aus dem Fermentansatz ausschüttelbar ist.

II,3 Chromatographische Untersuchungen der Oxydationsprodukte des 2,5 - Pyridindiols bei der Oxydation mit H_2O_2 /Peroxidase

II,3,1 Chromatographie der Oxydationsendprodukte

Um eine Übersicht über die bei der Oxydation von 2,5-Pyridindiol erhaltenen Produkte zu bekommen, wurden zunächst dünn-schichtchromatographische Untersuchungen durchgeführt.

Zu diesem Zweck wurden Reaktionsansätze bei $p_H 5$ und $p_H 7$ mit 1-6 Oxydationsäquivalenten Wasserstoffperoxid fünfmal konzentrierter an Pyridindiol und Ferment als bei den Ansätzen für spektrophotometrische Messungen benutzt.

Nach 48stündiger Reaktionszeit waren die Lösungen bei beiden p_H -Werten gelb gefärbt. Darin zeigt sich ein Unterschied zu den für spektrophotometrischen Messungen benutzten Ansätzen, bei denen nicht bei allen H_2O_2 -Konzentrationen die gelbe Endstufe erreicht wird.

Die Lösungen wurden durch Lyophilisation getrocknet, um eine schonende Aufarbeitung zu sichern, die Trockenrückstände mit 5 ml Wasser aufgenommen und von den Lösungen pro Startpunkt 0,05 ml auf Polyamid "Woelm DC"-Dünnschichtplatten, die mit einem Fluoreszenzindikator versehen waren, aufgetragen.

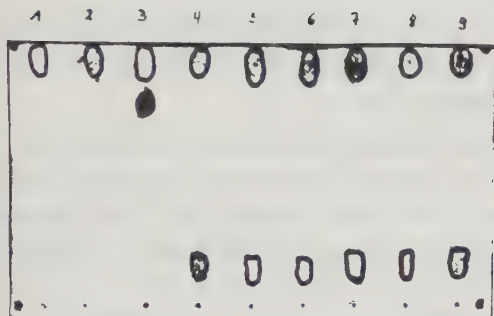
Es wurde mit den Laufmittelgemischen Isopropanol/Wasser/Pyridin 5:5:1 (v/v/v) und Aceton/Methanol/Pyridin 5:5:1 (v/v/v) aufsteigend chromatographiert.

CARELLI, LIQUORI und MELE (17) beschreiben Polyamid als gutes Sorbens für phenolische Stoffe.

Die Abb. 23 und 24 zeigen die Chromatogramme der Oxydationsendprodukte bei $p_H 5$ und $p_H 7$.

KE

Polyamid 1g 254
Isoprop H₂O Pyridin
5 : 5 : 1
FeCl₃



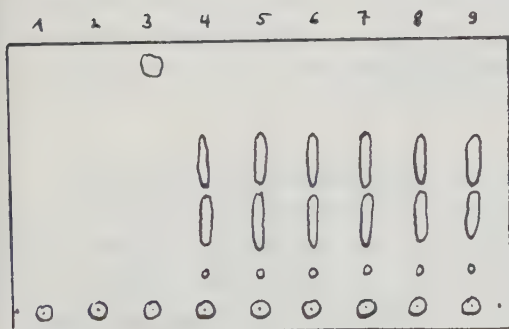
A braun mit FeCl₃
B violett mit "
bei 350 nm blau fluor.

gelb fluoresz.
C bei 350 nm

Abb. 23: Bahn 1 Puffer p_H5
Bahn 2 Puffer p_H5 + Ferment
Bahn 3 Puffer p_H5 + 2,5-Pyridindiol
Bahn 4-9 Reaktionsansätze nach 48 Stunden
mit 1-6 Oxval H₂O₂

KE

Polyamid 1g 254
Aceton MeOH Pyridin
5 : 5 : 1
FeCl₃



A violett mit FeCl₃
bei 350 nm blau fluor.

B gelbbraun fluoresz.
bei 350 nm

C hellblau fluoresz.
bei 350 nm

D

E nicht mit FeCl₃
anfärbbar

Abb. 24: Bahn 1 Puffer p_H7
Bahn 2 Puffer p_H7 + Ferment
Bahn 3 Puffer p_H7 + 2,5-Pyridindiol
Bahn 4-9 Reaktionsansätze nach 48 Stunden
mit 1-6 Oxval H₂O₂

Die Ansätze bei $p_H 7$ lassen auf dem Chromatogramm 3 getrennte Flecke durch Fluoreszenzlöschung bei 254 nm erkennen, die sich nicht mit $FeCl_3$ -Lösung anfärben lassen, aber selbst gelbbraun bzw. hellblau bei Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 350 nm fluoreszieren.

Die Ansätze bei $p_H 5$ lassen nur einen Fleck erkennen, der sich ebenfalls nicht mit $FeCl_3$ -Lösung anfärben läßt, bei 350 nm aber eine gelbe Fluoreszenz zeigt.

Chromatographisch ließ sich keine Beziehung zwischen den entstehenden Produkten und der steigenden H_2O_2 -Konzentration erkennen. Die Ansätze mit 1-6 Oxval zeigten auf dem Chromatogramm die gleichen Flecke, deren Beschaffenheit - Größe und Intensität der Fluoreszenz - etwa gleich war.

II,3,2 Chromatographie der Oxydationszwischenprodukte

Von besonderem Interesse sind die Oxydationszwischenprodukte. Auch hier wurde zunächst eine chromatographische Untersuchung durchgeführt. Dazu wurde ein Ansatz bei $p_H 5$ mit 5,55 mg 2,5-Pyridindiol, 4 Oxydationsäquivalenten H_2O_2 und 0,5 mg Peroxidase auf 500 ml Pufferlösung nach 20 Minuten mit Äthylacetat ausgeschüttelt, der Auszug eingeeengt und auf einer Polyamid-Dünnschichtplatte mit dem Laufmittelgemisch Aceton/Methanol/Pyridin 5:5:1 (v/v/v) chromatographiert. 4 Oxydationsäquivalente H_2O_2 wurden gewählt, weil bei dieser Konzentration bei $p_H 5$ nach etwa 20 Minuten die höchste Konzentration des roten Zwischenproduktes mit einem Maximum bei 513 nm und einer Schulter bei 542 nm erreicht ist (Abb. 15).

Abb. 25, Bahn 1 zeigt das chromatographierte Oxydationszwischenprodukt. Es besteht aus einem Gemisch von mindestens 3 Stoffen: Am Startpunkt bleibt ein violettcs Produkt liegen, darüber mit einem R_f -Wert $\sim 0,1$ ist ein blauer Fleck und mit einem R_f -Wert von $\sim 0,7$ ein leicht gelber Fleck zu lokalisieren. Der blaue Fleck färbt sich beim Besprühen mit $FeCl_3$ -Lösung rot an, der gelbe Fleck zeigt eine starke gelbe Fluoreszenz im UV-Licht bei 350 nm und färbt sich mit $FeCl_3$ -Lösung kirschrot an.

Zur Unterscheidung werden die drei Oxydationszwischenprodukte im folgenden mit fallendem Rf-Wert als Oxydationsprodukte A-C bezeichnet; das Produkt mit dem Rf-Wert $\sim 0,7$ also als Oxydationsprodukt A, das Produkt mit dem Rf-Wert $\sim 0,1$ als Oxydationsprodukt B und das am Startpunkt verbleibende Produkt als Oxydationsprodukt C.

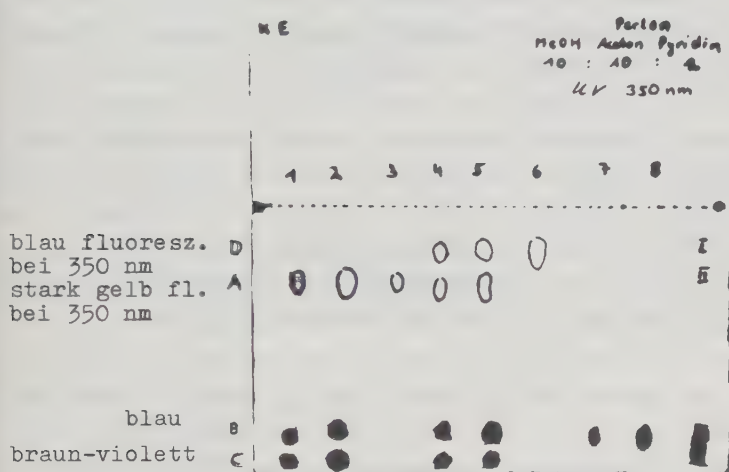


Abb. 25: A: Oxydationsprodukt A
 B: Oxydationsprodukt B
 C: Oxydationsprodukt C
 D: 2,5-Pyridindiol
 Bahn 3: Oxydationsprodukt A
 Bahn 6: 2,5-Pyridindiol

II,4 Herstellung der Oxydationsprodukte A-C

II,4,1 Gewinnung der Oxydationsprodukte A-C durch Ausschüttelung

Zur gemeinsamen Herstellung der Oxydationsprodukte A-C wurde aus Abb. 15 die günstigste H_2O_2 -Konzentration und der günstigste Zeitpunkt für eine Ausschüttelung mit möglichst hoher Ausbeute abgelesen. Die maximale Konzentration des Gemisches der Oxydationsprodukte A-C wird bei $p_H 7$ und 2-3 Oxval H_2O_2 nach etwa 7 Minuten erreicht, doch nimmt die Konzentration bei $p_H 7$ nach dieser Zeit auch sehr schnell wieder ab. Günstiger liegen die Verhältnisse bei $p_H 5$, wo die maximale Konzentration mit 3-4 Oxval nach etwa 20 Minuten erreicht wird und besonders bei 4 Oxval über längere Zeit erhalten bleibt. Diese Zeit reicht aus, um das Gemisch der Oxydationsprodukte mit dem organischen Lösungsmittel auszuschütteln.

Der rot gefärbte Essigesterauszug wurde im Umlaufverdampfer eingeeengt und danach zur Kristallisation im Kühlschrank aufbewahrt. Über Nacht fiel ein tief dunkelrot gefärbtes, glitzerndes Kristallisat aus, welches auf einer Glasfilternutsche gesammelt und in der Trockenpistole getrocknet wurde.

II,4,2 Gewinnung der Oxydationsprodukte A-C durch Kristallisation aus dem Fermentansatz

Eine einfache Methode zur Gewinnung der Oxydationsprodukte A-C stellt die direkte Auskristallisation aus der Reaktionslösung dar.

Durch Wahl geeigneter Konzentrationen von 2,5-Pyridindiol, Oxydationsmittel und Ferment konnten aus dem Ansatz ohne Puffer die Oxydationsprodukte A-C durch Auskristallisation direkt gewonnen werden. Dabei war zu beobachten, daß sich nach kurzer Zeit die Reaktionslösung trübte und tief dunkelrote, glitzernde Kristalle ausfielen. Diese wurden abgetrennt und getrocknet. Nach etwa 6 Stunden fiel aus dem Ansatz eine heller rote, stumpfe Substanz aus, die ebenfalls abgetrennt und getrocknet wurde.

Während das Produkt der ersten Kristallisation aus einem Gemisch etwa gleicher Teile der Oxydationsprodukte A-C bestand, enthielt das später ausfallende vorwiegend das Oxydationsprodukt B.

Nicht immer neigte das Gemisch zur spontanen, fraktionierten Kristallisation. In diesen Fällen konnte das Kristallisieren entweder durch Reiben mit dem Glasstab im Reaktionsgefäß provoziert werden oder die Lösung wurde im Umlaufverdampfer um etwa $1/3$ des Volumens eingeeengt und zur Kristallisation im Kühlschrank aufbewahrt. Im letzten Falle konnte eine fraktionierte Kristallisation nicht erreicht werden.

Die chromatographische Untersuchung des ausgefallenen Produktes zeigt Abb. 25, Bahn 2. Das erhaltene Produkt ist chromatographisch mit dem durch Ausschütteln der Fermentansätze mit Äthylacetat gewonnenen Produkt identisch. Mit FeCl_3 -Lösung ergaben die Flecke die gleichen Färbungen.

II,5 Präparative chromatographische Auftrennung der Oxydationsprodukte A-C und Gewinnung des Oxydationsproduktes A

Da durch fraktionierte Kristallisation vollkommen reine Komponenten nicht zu erhalten waren, meistens eine fraktionierte Kristallisation überhaupt nicht erreicht werden konnte, wurde ein anderer Weg zur präparativen Auftrennung der Oxydationsprodukte gesucht. Dieser bietet sich an, wenn man die Verhältnisse der Dünnschichtchromatographie auf die Säulenchromatographie übertragen kann. Da mit dem bei der Dünnschichtchromatographie verwendeten Laufmittelgemisch das Oxydationsprodukt B nicht von der Säule zu eluieren war, wurde ein anderes System gewählt.

Das Polyamid "Woelm DC" wird mit Aceton in die Säule geschlämmt und nach dem Auftragen des Gemisches der Oxydationsprodukte wird mit Dimethylformamid entwickelt.

Das Oxydationsprodukt A läuft mit gelber Farbe in nicht zu breiter Zone mit hohem R_f -Wert voraus. Das Eluat wird in einer Vorlage, in der sich Wasser befindet, aufgefangen, wobei ein gelb-braunes Produkt ausfällt, das nach mehrmaligem Umfällen aus Dimethylformamid mit Wasser chromatographisch einheitlich war.

Um das blaue Oxydationsprodukt B zu erhalten, welches auf dem Dünnschichtchromatogramm (Abb. 25, Bahn 1) durch einen R_f -Wert $\sim 0,1$ gekennzeichnet ist, muß eine größere Menge Elutionsmittel verwendet werden.

Es zeigte sich als günstig, Säulen mit großem Durchmesser und geringer Füllhöhe zu benutzen.

Aus dem blau gefärbten Eluat ist das Oxydationsprodukt B nicht zu isolieren, da die Lösung nicht stabil und nur im Kühlschrank über mehrere Tage unverändert haltbar ist. Aus der Lösung fällt auch nach Verdünnen mit Wasser nichts aus. Beim Abdestillieren des Dimethylformamids im Vakuum (20 mm Hg) wird eine Temperatur von etwa 50° erreicht, die bereits eine Veränderung der Lösung bewirkt.

Die beste Möglichkeit zur Isolierung des Oxydationsproduktes B stellt somit die Verwendung der zweiten Kristallfraktion aus dem präparativen Ansatz dar.

Diese enthält oft nur sehr wenig gelbes Oxydationsprodukt A, was chromatographisch leicht feststellbar ist.

Löst man diese isolierte Fraktion in konz. Schwefelsäure, wobei eine intensiv rote Lösung entsteht und fällt durch Wasserzugabe wieder aus, so erhält man nach mehrmaliger Wiederholung des Vorgangs ein Produkt, das chromatographisch sauber ist. (Abb. 25, Bahn 7). Getrocknet stellt die Substanz ein rotes Kristallpulver dar, welches in Dimethylformamid löslich ist.

Das Oxydationsprodukt C konnte nicht rein isoliert werden.

II,6 Präparative Darstellung des Oxydationsproduktes B

Da das im vorstehenden Abschnitt beschriebene Verfahren der Gewinnung des Oxydationsproduktes B sehr umständlich ist und sehr wenig Substanz liefert, wurde versucht, das Produkt auf einem anderen Wege, d.h. durch ein anderes Oxydationsmittel aus dem 2,5-Pyridindiol zu erhalten.

Als günstig erwies sich die Oxydation mit Tetrachlor-o-chinon, die von HORNER und DÜRKHEIMER (31) beschrieben wurde, in acetonischer Lösung. Aus dieser fiel durch Auskristallisieren ein Produkt an, welches sich erstens als chromatographisch einheitlich und zweitens mit dem fermentativ gewonnenen Produkt identisch erwies (Abb. 25, Bahn 8).

Diese Methode besitzt den Vorteil einer Ausbeute von etwa 70 % d. Th.

Ein weiterer Beweis für die Identität wurde in den übereinstimmenden Schmelzpunkten der aus beiden Produkten durch reduzierende Acetylierung erhaltenen Substanzen gefunden (s. S. 63).

II,7 Untersuchungen zur Strukturaufklärung der Oxydationsprodukte A und B

II,7,1 Strukturaufklärung des Oxydationsproduktes A

Das durch Säulenchromatographie isolierte Oxydationsprodukt A stellt ein gelbes, amorphes Pulver dar, welches in Wasser und in den meisten organischen Lösungsmitteln fast unlöslich ist. Wenig löslich ist es in Dimethylformamid. Leicht löslich ist es in Alkalien mit grüner Fluoreszenz, löslich ferner in konz. Schwefelsäure mit blauer Fluoreszenz, wobei aber eine Zersetzung nicht ausgeschlossen ist. In weniger konzentrierten Säuren ist es etwas löslich mit roter Farbe. Mit Eisen-III-chlorid gibt es eine kirschrote Farbe.

Nach dem Trocknen zersetzt sich die Substanz unter Braunfärbung bei 328° (Linström-Block).

Eine Molekulargewichtsbestimmung mit dem Dampfdruckosmometer ließ sich auf Grund der schlechten Lösungseigenschaften in organischen Lösungsmitteln nicht durchführen.

Aus dem IR-Spektrum (Abb. 26) läßt sich eine OH- oder NH-Gruppe nicht nachweisen, aber auch nicht ausschließen. Lediglich die C=O-Streckschwingung bei 1650 cm^{-1} ist zu erkennen.

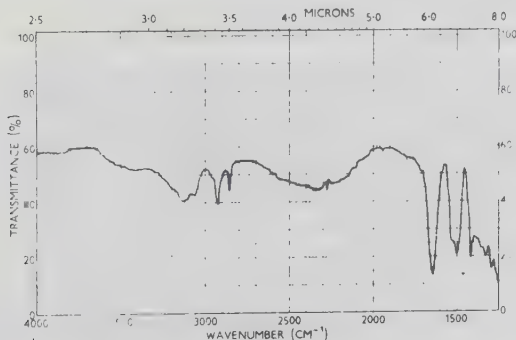


Abb.26: IR-Spektrum des 5,5'-Dihydroxy-6,6'-dipyridyl-2,2'(1,1'H)-dions (XXIV) in KBr.
Wellenzahlbereich: $1250-4000\text{ cm}^{-1}$

Die FeCl_3 -Reaktion gibt einen Hinweis auf das Vorhandensein einer phenolischen OH-Gruppe, doch kennt man andererseits vom 2,2-Dipyridyl eine ähnliche Farbreaktion.

Um eine OH- oder NH-Gruppe zu beweisen wurde versucht, das Acetyl- bzw. Benzoylderivat darzustellen. Die Benzoylierung ergab ein Produkt, welches aus glänzenden, farblosen Kristallnadeln bestand und nach dem Trocknen einen Schmelzpunkt von $227,3^\circ$ aufwies. Dieses Produkt ist gut in Chloroform und Aceton, weniger in den niederen Alkoholen und praktisch nicht löslich in Wasser.

Das Molekulargewicht ergab 619 (CHCl_3). Die Benzoylgruppenbestimmung ergab 0,00 und 0,09% Benzoyl (flüchtige Säure als $\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}$ berechnet).

Nicht zu erklären sind die Ergebnisse der Benzoylgruppenbestimmung, obwohl das IR-Spektrum deutlich bei 1745 cm^{-1} die Carbonylbande der Estergruppe zeigt. OH- und NH-Valenzschwingungen sind nicht zu beobachten (Abb. 27).

Die Benzoylgruppenbestimmung des auf die gleiche Weise hergestellten 2,5-Dibenzoxypyridins (XX) ergab 63,18 %. (ber. für $\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{O}_4\text{N}$ 65,84 %).

Im IR-Spektrum ist auch hier die Carbonylbande der Estergruppen bei 1745 cm^{-1} zu sehen (Abb. 31).

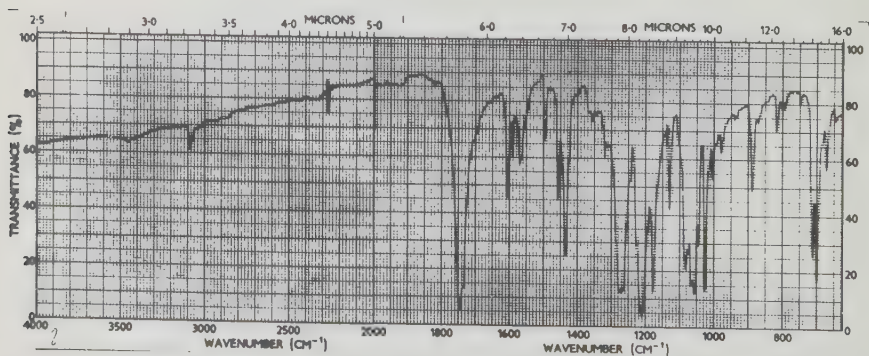


Abb.27: IR-Spektrum des 2,2',5,5'-Tetrabenzoxo-6,6'-dipyridyls (XXIII) in KBr (Pressling IR-getrocknet). Wellenzahlbereich: $625-4000\text{ cm}^{-1}$

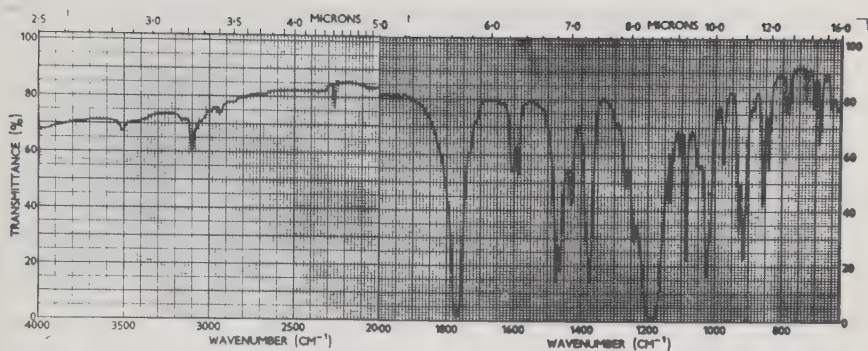


Abb.28: IR-Spektrum des 2,2',5,5'-Tetraacetoxy-6,6'-dipyridyls (XXII) in KBr (Pressling IR-getrocknet).

Wellenzahlbereich: 625-4000 cm^{-1}

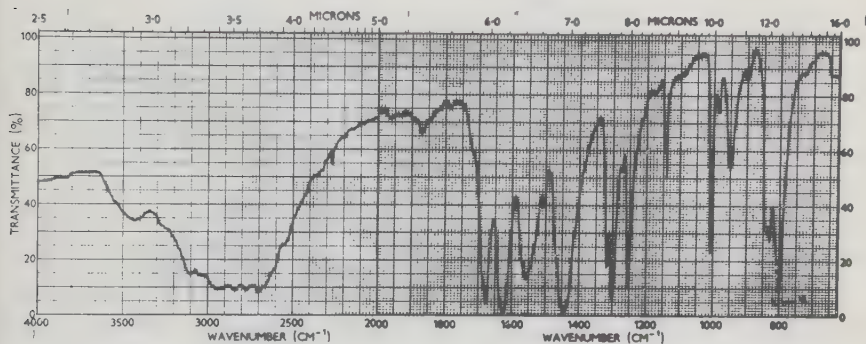


Abb.29: IR-Spektrum des 2,5-Pyridindiol (XVI) in KBr.

Wellenzahlbereich: 625 - 4000 cm^{-1}

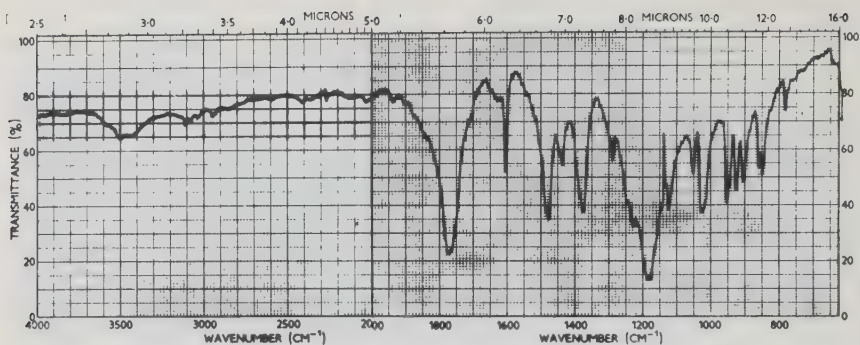


Abb.30: IR-Spektrum des 2,5-Diacetoxypyridins (XXI) in KBr.
Wellenzahlbereich: 625 - 4000 cm^{-1}

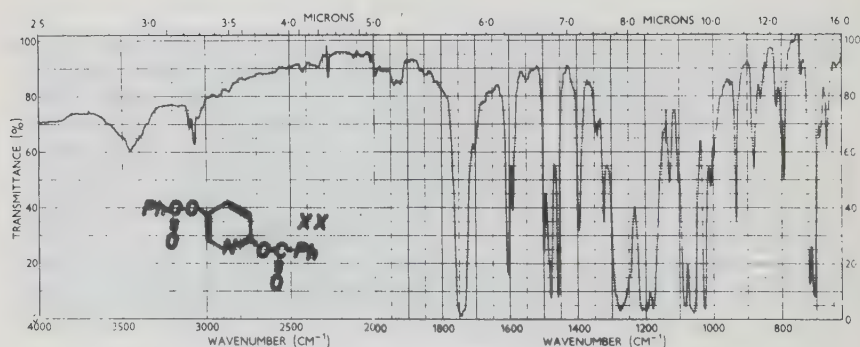


Abb.31: IR-Spektrum des 2,5-Dibenzoxypyridins (XX) in KBr.
Wellenzahlbereich: 625 - 4000 cm^{-1}

Da die Benzoylgruppenbestimmung zu einem nicht erklärbaren Ergebnis führte, wurde die entsprechende Acetylverbindung hergestellt. Es wurden farblose Nadeln erhalten, die getrocknet einen Schmelzpunkt von $171,6^\circ$ zeigten.

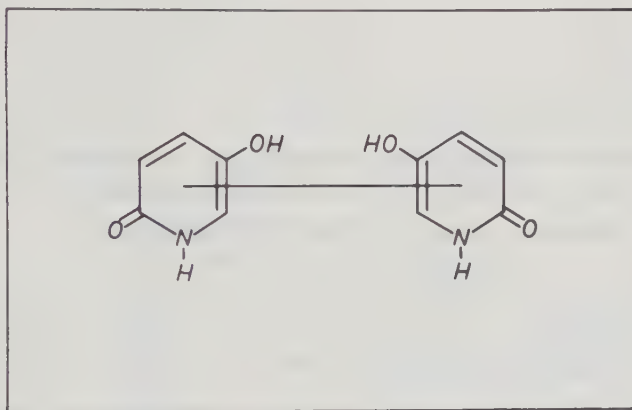
Das Molekulargewicht wurde mit 382 (CHCl_3) bestimmt. Die Acetylgruppenbestimmung ergab 42,30 % CH_3CO .

Daraus ergeben sich für das gefundene Molekulargewicht 3,75 Acetylgruppen pro Molekül.

Das IR-Spektrum (Abb. 28) zeigt die Carbonylbande der Ester-

gruppen bei 1770 cm^{-1} , OH- und NH-Valenzschwingungen sind nicht zu beobachten. Abb. 29-31 zeigt zum Vergleich die IR-Spektren des 2,5-Pyridindiols, des 2,5-Diacetoxypyridins und des 2,5-Dibenzoxypyridins.

Auf Grund der hohen Molekulargewichte des acetylierten und benzoyleierten Oxydationsproduktes A sowie des Wertes der Acetylgruppenbestimmung wurde für das Oxydationsprodukt A folgende Formel postuliert:



Dimerisierungen sind, wie in dem einleitenden Teil schon gezeigt wurde, durchaus nicht ungewöhnlich bei der Oxydation von Phenolen mit dem System Peroxidase/ H_2O_2 , wobei als bevorzugte Verknüpfungsstelle bei besetzter p-Stellung, wie im vorliegenden Fall, die o-Stellung zur Hydroxylgruppe gilt.

Um die Verknüpfungsstelle zu beweisen, wurden vom 2,5-Diacetoxypyridin (XXI) und vom 2,2',5,5'-Tetraacetoxy-6,6'-dipyridyl (XXII) NMR-Spektren angefertigt. ⁺⁾ Das Spektrum von XXI ist in Abb. 32, das Spektrum von XXII in Abb. 33 zu sehen. Die Meßwerte sind in Tabelle VI zusammengefaßt.

⁺⁾ Die Aufnahmen der Kernresonanzspektren wurden zum Teil dankenswerterweise von der Fa. Schering AG, Berlin, mit einem Varian A-60-Gerät aufgenommen. Mein besonderer Dank gilt den Herren Dr. Schulz und Dr. Neudert für die erwiesene Freundlichkeit und Diskussionsbereitschaft.

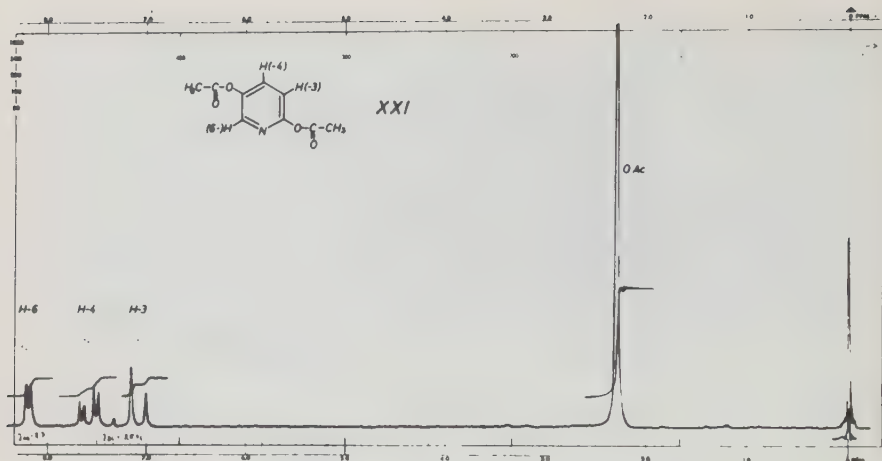


Abb.32: Kernresonanzspektrum des 2,5-Diacetoxypyridins (XXI) in CDCl_3 . TMS (Tetramethylsilan) als innerer Standart. Registrierbereich 500 Hz

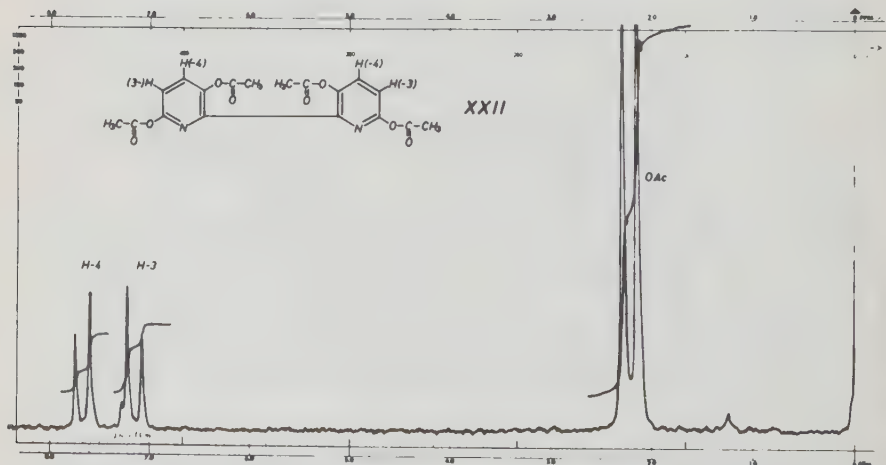


Abb.33: Kernresonanzspektrum des 2,2',5,5'-Tetraacetoxy-6,6'-dipyridyls (XXII) in CDCl_3 . TMS als innerer Standart. Registrierbereich 500 Hz

Ringprotonen	2,5-Diacetoxypyridin	2,2',5,5'-Tetraacetox-6,6'-dipyridyl	Unsubst. Pyridin
H-3	7,07 ppm (d) $J_{34} = 8,5 \text{ Hz}$	7,16 ppm (d) $J_{34} = 8,5 \text{ Hz}$	7,38 ppm $J_{34} 8-10 \text{ Hz}$
H-4	7,58 ppm (q) $J_{34} = 8,5 \text{ Hz}$ $J_{46} = 2,7 \text{ Hz}$	7,69 ppm (d) $J_{34} = 8,5 \text{ Hz}$	7,75 ppm
H-6	8,21 ppm (d) $J_{46} = 2,7 \text{ Hz}$		8,29 ppm $J_{46} \text{ ca. } 2 \text{ Hz}$

Tabelle VI: Vergleich der NMR-Signale von 2,5-Diacetoxypyridin, 2,2',5,5'-Tetraacetox-6,6'-dipyridyl und unsubstituiertem Pyridin und ihrer Kopplungskonstanten.

d = Dublett

q = Quadruplett

Die Spektren des mehrfach substituierten Pyridins ergeben einfachere Spektraltypen als die Stammverbindung.

Die Bande des α -Protons ist weit nach tiefem Feld verschoben und deutlich von denen der übrigen Ringprotonen getrennt (64).

Die Kopplungskonstanten des Pyridins betragen: $J_{23} = 5,5 \text{ Hz}$, $J_{24} = 1,9 \text{ Hz}$, $J_{25} = 0,9 \text{ Hz}$, $J_{26} = 0,4 \text{ Hz}$, $J_{34} = 7,5 \text{ Hz}$ und $J_{35} = 1,6 \text{ Hz}$. Bei den Pyridinderivaten können kleine Abweichungen von diesen Werten auftreten.

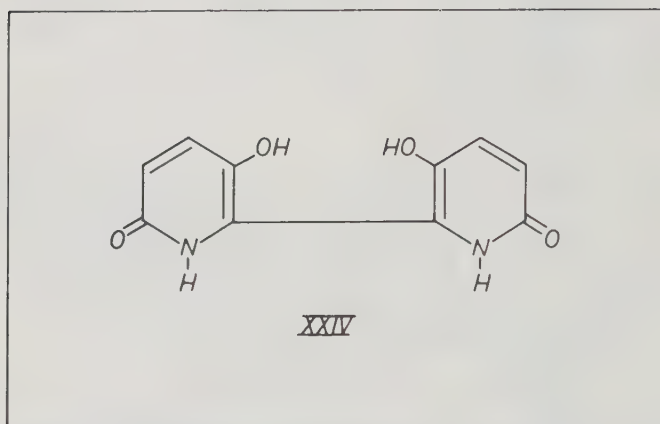
Danach ist die Zuordnung der Ringprotonen in Tabelle VI gesichert.

Beim 2,5-Diacetoxypyridin erscheint das α -Proton nach tiefem Feld verschoben, die Kopplungskonstante weist auf die m-Kopplung hin. Das H-4 weist neben der m-Kopplung noch die o-Kopplung mit der Konstanten $J_{34} = 8,5 \text{ Hz}$ auf.

Das NMR-Spektrum des 2,2',5,5'-Tetraacetox-6,6'-dipyridyls zeigt das H-6-Signal nicht mehr, die des H-3 und H-4 sind etwas nach tiefem Feld verschoben. Der Wert $J_{34} = 8,5 \text{ Hz}$ gibt

die o-Kopplung an. 4 Acetylgruppen lassen sich durch 12 Methylprotonen bei 2,16 und 2,30 ppm beweisen.

Danach ist für das Oxydationsprodukt A folgende Struktur gesichert:



Elementaranalysen:

5,5'-Dihydroxy-6,6'-dipyridyl-2,2'-(1,1'-H)-dion (XXIV)

Ber. C: 54,67 % H: 3,66 % N: 12,73 %

Gef. C: 57,57 % H: 5,12 % N: 12,58 %

2,2',5,5'-Tetraacetoxy-6,6'-dipyridyl (XXII)

Ber. C: 55,67 %	H: 4,15 %	N: 7,21 %	Acetyl: 43,82 %
			Mol.Gew. 388,3

Gef. C: 55,11 %	H: 4,22 %	N: 7,22 %	Acetyl: 42,30 %
			Mol.Gew. 382

2,2',5,5'-Tetrabenzoxo-6,6'-dipyridyl (XXIII)

Ber. C: 71,69%	H: 3,80%	N: 4,40%	Benzoyl: 66,05%
			Mol.Gew. 636,6

Gef. C: 71,33%	H: 3,93%	N: 4,43%	Benzoyl: 0,00%; 0,09%
			Mol.Gew. 619

Für das 5,5'-Dihydroxy-6,6'-dipyridyl-2,2'-(1,1'-H)-dion (XXIV) (Oxydationsprodukt A) ist die Übereinstimmung der errechneten und gefundenen Werte nicht ausreichend. Für die Acetyl- und Benzoylderivate dagegen stimmen die Werte hinreichend überein, wenn man von der Benzoylgruppenbestimmung des 2,2',5,5'-Tetrabenzoxo-6,6'-dipyridyls absieht.

Daß es sich bei den Acetyl- und Benzoylderivaten um O-Acylderivate handelt, zeigt der Vergleich der IR-Spektren (Abb. 27 - 31): Die Bande bei 1675 cm^{-1} im IR-Spektrum des 2,5-Pyridindiolis (XVI) wird der Carbonylgruppe der Säureamidgruppierung zugeschrieben (49). Diese Bande müßte bei N-Acylderivaten noch vorhanden sein. Wie die IR-Spektren aber zeigen, fehlt diese Bande bei den acylierten Derivaten (Abb. 27, 28, 30, 31).

Es kann abschließend festgestellt werden, daß, wie die Strukturaufklärung des Oxydationsproduktes A gezeigt hat, bei der Oxydation von 2,5-Pyridindiol mit dem System Peroxidase/ H_2O_2 ein Produkt gebildet wird, das in das Schema der bei der Oxydation von Phenolen entstehenden Produkte paßt.

II,7,2 Untersuchungen zur Strukturaufklärung des Oxydationsproduktes B

Zur Strukturaufklärung des durch fermentative Oxydation mit dem System Peroxidase/ H_2O_2 gewonnenen Oxydationsproduktes B wurde zunächst untersucht, ob dieses mit dem durch Oxydation mit Tetrachlor-o-chinon erhaltenen Produkt identisch ist. Der gleiche Rf-Wert bei der Dünnschichtchromatographie und das gleiche chemische Verhalten gegenüber Säuren und Laugen ist nicht allein beweisend. Die Identität konnte durch hinreichend übereinstimmende IR-Spektren bewiesen werden (Abb. 34).

Zum besseren Verständnis dieses Kapitels sollen zunächst zwei Arbeiten genannt werden, die die Oxydation von Pyridinolen und Pyridindiolen zum Inhalt haben, und die im engen Zusammenhang mit der eigenen Arbeit stehen, wie sich im Laufe der Untersuchungen herausgestellt hat.

II,7,2,1

Von KUDERNATSCH (39) wird ein Pyridinchinon (Azabenzochinon) beschrieben, welches durch Oxydation eines Pyridindiolis mit Mangandioxid in saurer Lösung erhalten wurde. Da Kudernatsch von einem Pyridindiol ausging, welches er durch Alkalischemelze von 3-Pyridinol erhalten hatte und nach vergleichenden Untersuchungen mit den bis dahin bekannten Pyridindiolen als 2,5-Pyridindiol bezeichnete, erhielt er nach seiner Annahme das p-Pyridinchinon. O-Chinone waren zu dieser Zeit noch nicht bekannt.

Während KOENIGS, GERDES und SIROT (36) noch die Bezeichnung 2,5-Pyridindiol für das von Kudernatsch hergestellte Pyridindiol übernehmen, weisen v.SCHICK, BINZ und SCHULZ (59) bereits auf diese falsche Annahme hin. Das von ihnen auf anderem Wege dargestellte 2,5-Pyridindiol ist mit dem von Kudernatsch beschriebenen Produkt zweifelsfrei nicht identisch. Kudernatsch hatte durch Alkalischemelze aus 3-Pyridinol das 2,3-Pyridindiol erhalten, womit das beschriebene, durch Oxydation mit MnO_2 erhaltene Pyridinchinon

bestenfalls ein o-Pyridinchinon sein konnte.

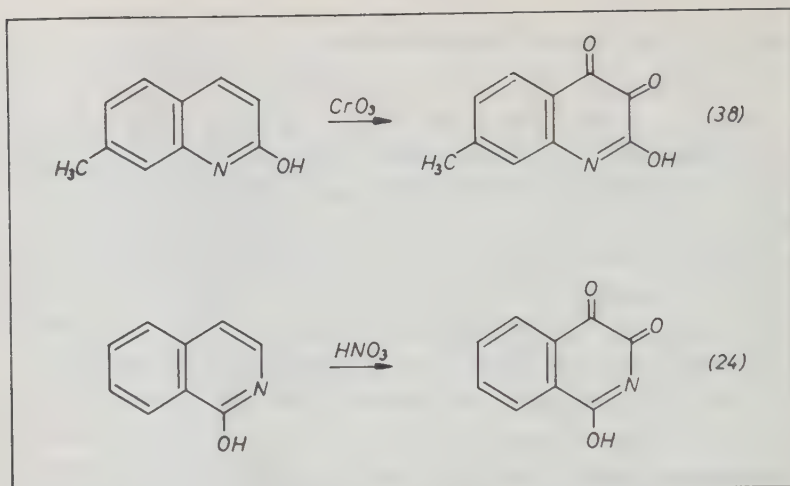
Das Pyridinchinon wird von Kudernatsch wie folgt beschrieben: "Ein schweres, braun-violettes, mikrokristallines Pulver, welches beim Reiben mit dem Glasstab einen Metallglanz annimmt. Es wird spurenweise von Wasser aufgenommen und löst sich fast nicht in den gebräuchlichen Lösungsmitteln. Starke Säuren, vor allem Schwefelsäure, lösen das Chinon leicht auf. Verdünnte Alkalien lösen den Körper mit prächtig blauer Farbe auf. Die alkalischen Lösungen sind aber nicht beständig und werden durch die Einwirkung des Luftsauerstoffs beim Stehen bald violett und endlich soweit entfärbt, daß die Flüssigkeit einen hell gelbroten Farbton annimmt. Im Kapillarröhrchen erhitzt, verändert sich das Chinon nicht bis 200° und verkohlt bei höherer Temperatur ohne zu schmelzen."

Kudernatsch reduziert das von ihm hergestellte Pyridinchinon mit Natriumamalgam und weist durch "charakteristische" FeCl_3 -Reaktion 2,5-Pyridindiol nach. Er gibt für die gefundene Substanz keine näheren Angaben. Die Annahme eines p-Pyridinchinons mußte sich als falsch erweisen, nachdem sich herausstellte, daß durch Alkalischmelze des 3-Pyridinols das 2,3-Pyridindiol entsteht.

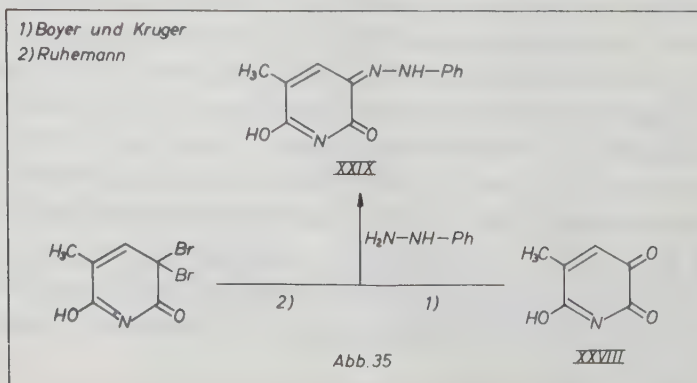
II,7,2,2

BOYER und KRUGER (15) haben versucht Azachinone durch Oxydation von Aminopyridonen mit verschiedenen Oxydationsmitteln wie Mangandioxid, Chrom-III-oxid und Kaliumbromat herzustellen. Dieses gelang ihnen nicht. Sie fanden durch Oxydation des 3- und 5-Aminopyridon-2 (XXV,XXVI) die gleiche Substanz (XXVII), die Kudernatsch durch Oxydation von 2,3-Pyridindiol mit MnO_2 erhalten und als Pyridinchinon beschrieben hat. Die Identität der Substanzen wird von Boyer und Kruger durch reduzierende Acetylierung mit Zinkstaub und Acetanhydrid erbracht. In allen Fällen wird das gleiche Produkt erhalten.

Sie stellten fest, daß neben der Oxydation zum Chinon eine Hydroxylierung eingetreten ist. Andere Beispiele für Hydroxylierungen an N-Heterocyclen sind aus der Literatur bekannt (38), (24):



Auf Grund der schlechten Ausbeute wird von Boyer und Kruger auf eine Chinhydronbildung geschlossen. Neben dem 3- und 5-Aminopyridon-2 setzen sie auch die 5- bzw. 3-Methylderivate ein und erhalten das 5-Methyl-6-hydroxypyridin-o-chinon (XXVIII) bzw. das 3-Methyl-6-hydroxypyridin-p-chinon, die im tautomeren Gleichgewicht stehen. Die Hydroxylierung hat in der 6-Stellung stattgefunden. Den Beweis der α -Hydroxylierung führen sie durch Vergleich des mit Phenylhydrazin erhaltenen Phenylhydrazons (XXIX) mit dem von RUHEMANN (54) auf anderem Wege erhaltenen 1-Aza-2-keto-3-phenylhydrazo-5-methyl-6-hydroxycyclohexadien (XXIX). Es werden in beiden Fällen gelbrote Nadeln mit einem Zersetzungspunkt bei 240° erhalten (Abb. 35). Der Beweis der α -Hydroxylierung bei freier 3- bzw. 5-Stellung wird von Boyer und Kruger nicht angetreten.



II,7,2,3

Den Arbeiten von Kudernatsch sowie den Arbeiten von Boyer und Kruger sollen die eigenen Untersuchungen gegenübergestellt werden.

Beim Nacharbeiten der von Kudernatsch angegebenen Methode der Oxydation von 2,3-Pyridindiol mit MnO_2 wurde eine Substanz erhalten, welche die angegebenen Eigenschaften besaß und sich zunächst chromatographisch als identisch mit dem aus 2,5-Pyridindiol durch fermentative Oxydation sowie durch Oxydation mit Tetrachlor-o-chinon erhaltenen Oxydationsprodukt B erwies. Später wurde die Identität der durch verschiedene Oxydationsmittel aus 2,3-Pyridindiol und 2,5-Pyridindiol erhaltenen Oxydationsprodukte durch Vergleich der Schmelzpunkte und Mischschmelzpunkte des bei der reduzierenden Acetylierung gewonnenen Hexaacetoxypyridyls bewiesen.

Anschließend wurde nun versucht, nach Kudernatsch ein p-Pyridinchinon aus 2,5-Pyridindiol durch Oxydation mit MnO_2 in saurer Lösung herzustellen. Es gelang nach dieser Methode eine Substanz zu gewinnen, welche nach mehrmaligem Umfällen aus konz. Schwefelsäure chromatographisch einheitlich und zudem mit dem auf fermentativem Wege und durch Oxydation mit Tetrachlor-o-chinon hergestellten Oxydationsprodukt B identisch war.

Das in der vorliegenden Arbeit aus 2,5-Pyridindiol auf verschiedenen Wegen erhaltene Oxydationsprodukt B ist mit der von Kudernatsch aus 2,3-Pyridindiol durch Oxydation mit MnO_2 erhaltenen Substanz, wie gezeigt wurde, identisch. Andererseits haben Boyer und Kruger die Identität ihres Oxydationsproduktes, welches sie aus den Aminopyridonen durch Oxydation erhalten haben, mit der von Kudernatsch erhaltenen Substanz bewiesen. Folglich muß das Oxydationsprodukt B auch mit dem von Boyer und Kruger gefundenen, von ihnen als Hydroxypyridinchinon bezeichneten Oxydationsprodukt identisch sein.

Abb. 36 soll die angegebenen Arbeiten veranschaulichen.

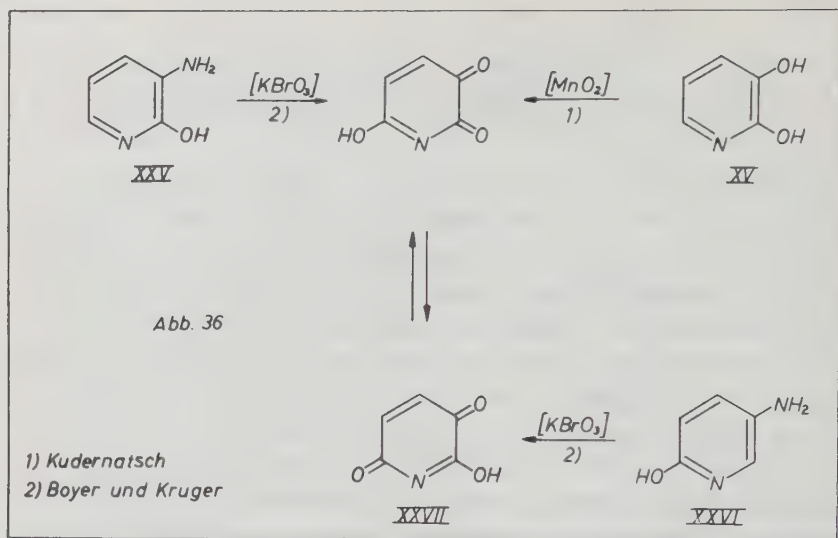


Tabelle VII gibt eine Zusammenstellung der wichtigsten Fakten, der auf den verschiedenen Wegen dargestellten Substanz XXVII.

Kudernatsch (39) auf Weg 1)	Braunviolette, mikrokristallines Pulver mit Metallglanz, Zersetzungspunkt über 200°. Fast unlöslich in den gebräuchlichen Lösungsmitteln, gut löslich in konz. H ₂ SO ₄ mit roter Farbe, in Alkalien mit blauer Farbe. Die alkalische Lösung zersetzt sich unter Entfärbung und Ammoniakentwicklung. <u>Elementaranalyse</u> : C: 54,45%; H: 2,99%; N: 12,55%
Boyer und Kruger (15) auf Weg 2)	Purpur-braune Mikrokristalle mit grünem Glanz, Zersetzung über 300°. Unlöslich in allen gewöhnlichen Lösungsmitteln, löslich in Alkalien mit blauer Farbe. Zersetzung dieser Lösung

	unter Entfärbung und NH_3-Entwicklung. <u>Elementaranalyse:</u> C: 48,15%; H: 2,76%; N: 11,80%
Eigene Arbeit: Oxydation mit Peroxidase/H_2O_2, MnO_2 und Tetrachlor-o-Chinon	Blaue Kristallnadeln mit Metallglanz (nach dem Trocknen über P_2O_5 bei $60^\circ/20$ mm Hg stumpf rot), Zersetzung über 300° (Linströmblock). Fast unlöslich in allen gebräuchlichen Lösungsmitteln, wenig löslich in Pyridin und Dimethylformamid, gut löslich in konz. H_2SO_4 mit roter Farbe und in Alkalien mit blauer Farbe, die schnell verblaßt, wobei NH_3-Entwicklung zu bemerken ist. <u>Elementaranalyse:</u> C: 47,81%; H: 2,66%; N: 10,96%. <u>Mol.Gew.:</u> 250
Nach Kudernatsch:	Berechnet für $\text{C}_5\text{H}_3\text{NO}_2$ (Pyridinchinon) C: 55,05%; H: 2,77%; N: 12,84% Berechnet für $\text{C}_5\text{H}_3\text{NO}_3$ (Hydroxypyridinchinon) C: 47,99%; H: 2,42%; N: 11,20%
Nach Boyer und Kruger:	Berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_6$ (Pyridinchinhydron) C: 47,62%; H: 3,20%; N: 11,11%

Tabelle VII

Die von Kudernatsch beschriebene Reduktion mit Natriumamalgam führte beim Oxydationsprodukt B nicht zum 2,5-Pyridindiol, was durch vergleichende Dünnschichtchromatographie festgestellt wurde. Es wurden keine Reaktionsprodukte gefunden, die sich mit FeCl_3 anfärben lassen. Offensichtlich wird das Oxydationsprodukt bei der Reduktion mit Natriumamalgam zerstört.

Wegen der Farbigkeit, der schlechten Löslichkeit in Wasser sowie der guten Löslichkeit in konz. Schwefelsäure wurde ein Produkt mit chinoider Struktur vermutet. Wegen der schlechten Lösungseigenschaften konnte eine Molekulargewichtsbestimmung mit dem Dampfdruckkosmometer nicht durchgeführt werden.

Die von THIELE (68) beschriebene hydroxylierende Acetylierung von Chinonen, die zu einem farblosen triacetylierten Pyridintriführer müßte, ergab nicht das erwartete, sondern ein orangefarbenes Produkt, welches ebenfalls fast unlöslich in den gebräuchlichen Lösungsmitteln war und sich zudem empfindlich gegen Alkalien zeigte.

Arbeitet man nach einer Variante von BURTON und PRAILL (16), die Perchlorsäure an Stelle von Schwefelsäure verwenden, erhält man ebenfalls das schon beschriebene orangefarbene Produkt.

Mit Semicarbacid, Hydroxylamin und Benzolsulfinsäure nach HINSBERG (27) (28) ließen sich keine entsprechenden Derivate isolieren. Auch die Kondensation mit o-Phenylendiamin zum Phenazinderivat nach TEUBER und STAIGER (66) gelang nicht.

Zu diesen negativen Ergebnissen ist aber zu bemerken, daß erstens nur sehr kleine Substanzmengen eingesetzt wurden (20 mg) und zweitens das umzusetzende Oxydationsprodukt B nur sehr schlecht in den verwendeten Lösungsmitteln löslich war.

Nun zeigt das IR-Spektrum des Oxydationsproduktes B zwischen 3000 und 3500 cm^{-1} starke, breite Banden, die auf das Vorhandensein von OH- oder NH-Gruppen im Molekül schließen lassen (Abb. 34).

Der Versuch einer Acetylierung nach den üblichen Verfahren führte jedoch immer zu dem schon beschriebenen orangefarbenen Produkt, wie es auch nach Thiele erhalten wird.

Boyer und Kruger erhalten durch reduzierende Acetylierung von XXVII mit Zinkstaub und Acetanhydrid nach chromatographischer Reinigung auf einer Aluminiumoxidsäule und Umkristallisation

aus Äthanol schwach cremefarbene Blättchen mit einem Schmelzpunkt von 159° . Die Substanz wurde als 2,5,6-Triacetoxypyridin bezeichnet. Nach der gegebenen Vorschrift wurde eigenes Oxydationsprodukt B sowohl aus der fermentativen Oxydation, als auch aus der Oxydation mit Tetrachlor-o-chinon und MnO_2 der reduzierenden Acetylierung unterworfen.

Es wurden schwach gelbliche Kristalle erhalten, die nach dem Trocknen Schmelzpunkte zwischen $156,4^{\circ}$ und $157,1^{\circ}$ hatten. Der Mischschmelzpunkt lag bei $156,9^{\circ}$.

Elementaranalyse:

Ber. für $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{NO}_6$ (Triacetoxypyridin)

C: 52,18% H: 4,38% N: 5,53% Acetyl: 51,00% Mol.Gew.: 253,2

Ber. für $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_{12}$ (Hexaacetoxydipyridyl)

C: 52,38% H: 3,99% N: 5,55% Acetyl: 51,20% Mol.Gew.: 504,4

Gef. (eigene Substanz)

C: 52,26% H: 4,17% N: 5,50% Acetyl: 47,57% Mol.Gew.: 495/494
(CHCl_3)

Gef. (Boyer und Kruger)

C: 52,58% H: 4,30% N: 5,78% Acetyl: -- -- Mol.Gew.: ---

Der Vergleich der Schmelzpunkte und der Elementaranalysenwerte läßt auf eine Identität der durch reduzierende Acetylierung gewonnenen Substanzen schließen.

Leider wird von Boyer und Kruger kein Molekulargewicht der erhaltenen Substanz angegeben.

Auf Grund der eigenen Molekulargewichtsbestimmung mit dem Dampfdruckosmometer muß auf ein dimeres Pyridinderivat geschlossen werden.

Die Acetylgruppenbestimmung deutet bei Zugrundelegung des gefundenen Molekulargewichtes auf 5,5 Acetylgruppen im Molekül.

Das IR-Spektrum (Abb. 37) zeigt die Carbonylbande der Estergruppen bei 1780 cm^{-1} . OH- und NH-Valenzschwingungen sind nicht zu beobachten.

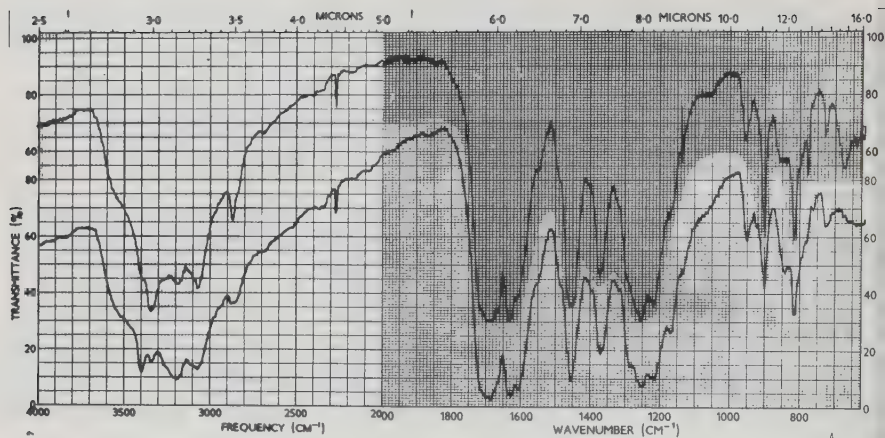


Abb.34: IR-Spektren des Oxydationsproduktes B durch fermentative Oxydation mit H₂O₂/Peroxidase (unten) und durch Oxydation mit TCC (oben) gewonnen, in KBr. Wellenzahlbereich 625-4000 cm⁻¹. TCC = Tetrachlor-o-chinon

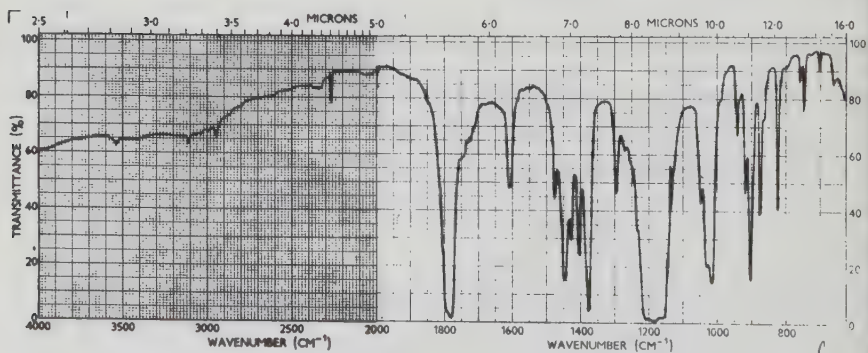


Abb.37: IR-Spektrum des Hexaacetoxypyridyls (XXX; XXXI) in KBr (Pressling IR-getrocknet). Wellenzahlbereich 625 - 4000 cm⁻¹

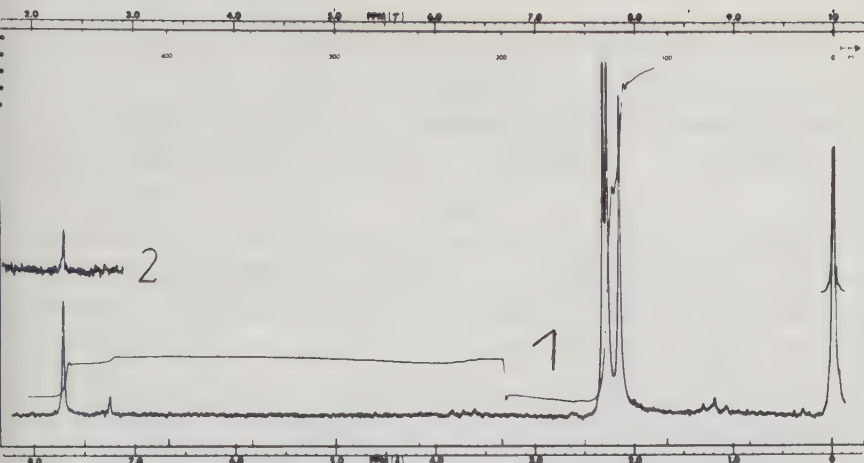
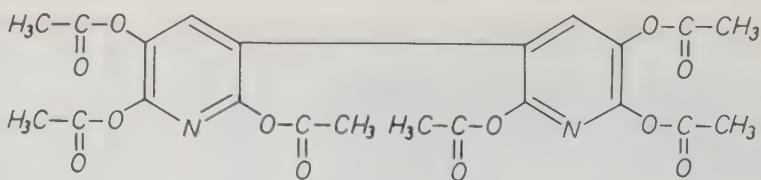


Abb.38: Kernresonanzspektren des Hexaacetoxypyridyls
(XXX;XXXI) in CDCl_3 1)
und des Oxydationsproduktes B in DMSO 2)
TMS als innerer Standart. Registrierbereich
500 Hz.

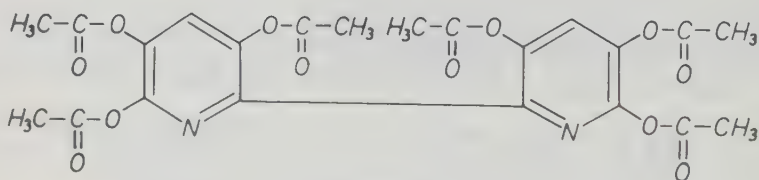
Der Beweis für das Vorliegen eines Hexaacetoxypyridyls lieferte das NMR-Spektrum (Abb. 38,1).

Bei 7,72 ppm ist ein Singulett zu finden, welches dem γ -Proton zuzurechnen ist und die Symmetrie des Moleküls anzeigt. Außerdem ist aus dem Spektrum durch 18 Methylprotonen das Vorhandensein von 6 Acetoxygruppen abzulesen.

Offen bleibt die Frage, in welcher Stellung die Hydroxylierung stattgefunden hat und an welcher Stelle die Verknüpfung der Pyridinkerne eingetreten ist. Mit Sicherheit ist nur zu sagen, daß weder das eine noch das andere in γ -Stellung geschehen ist. Zwei Strukturen sind als möglich anzunehmen:



XXX



XXXI

In der Struktur XXX ist die Hydroxylierung in 6-Stellung erfolgt, wie von Boyer und Kruger angegeben, aber nicht bewiesen wurde, die Verknüpfung der Pyridinkerne fand in 3-Stellung statt. In der Struktur XXXI muß eine Hydroxylierung in 3-Stellung angenommen werden, wobei die Pyridinkerne über die 6-Stellung dimerisieren.

Offen blieb zunächst außerdem die Frage, ob die Dimerisierung erst bei der reduzierenden Acetylierung eingetreten ist, was aber unter den vorliegenden Verhältnissen unwahrscheinlich ist. Diese Frage wurde später durch das Massenspektrum eindeutig geklärt (s. S. 68).

Die schlechten Lösungseigenschaften des Oxydationsproduktes B würden für ein dimeres Produkt sprechen. Die gleiche Eigenschaft ist es auch, die die Aufnahme eines NMR-Spektrums erschwert. Der Versuch, ein NMR-Spektrum vom Oxydationsprodukt B in pentadeutertem Pyridin aufzunehmen, weil dieses noch die besten Lösungseigenschaften besitzt, führte zu keinem Ergebnis. Das Oxydationsprodukt B löste sich nicht in gewünschtem Maße in Pyridin (unter 1%). Ein Spektrum in

Dimethylsulfoxid aufgenommen, zeigt ein Singulett bei 7,72 ppm, das dem γ -Proton zuzurechnen ist (Abb. 38,2).

Nach SUHR (64) eignet sich Dimethylsulfoxid wegen seiner guten Lösungseigenschaft für die Aufnahme von NMR-Spektren vieler Pyridinderivate.

Es ist jedoch kein inertes Lösungsmittel und die erhaltenen Daten entsprechen nicht denen der freien, unsolvatisierten Moleküle. Lösungsmittelleffekte sind in dieser Stoffklasse, besonders aber bei Hydroxy- und Aminoverbindungen sehr groß.

So geht aus dem NMR-Spektrum nicht mit Sicherheit hervor, ob das Oxydationsprodukt B bereits vor der reduzierenden Acetylierung dimer vorliegt.

Weitere Versuche der Aufnahme von NMR-Spektren in Dimethylacetamid und Trifluoressigsäure führten zu keinem Ergebnis, da sich die Substanz offensichtlich in beiden Lösungsmitteln veränderte.

Das Massenspektrum ⁺) von XXX bzw. XXXI (Abb. 39) läßt den Molekularpeak, der bei der Massenzahl 504 zu erwarten ist, nicht erkennen, da das Hexaacetoxydipyridyl bei der Messung sofort unter Verlust eines Bruchstückes der Massenzahl 42 (Keten), also unter Verlust einer Acetylgruppe, zerfällt. Unter weiterem Verlust von 5 mal 42 Masseneinheiten, entsprechend der Abspaltung von 5 Acetylgruppen, ist bei der Massenzahl 252 der Peak des Hexahydroxydipyridyls zu beobachten.

⁺) Für die Aufnahmen der Massenspektren gilt Herrn P. Ziegler von der Varian Ass. besonderer Dank

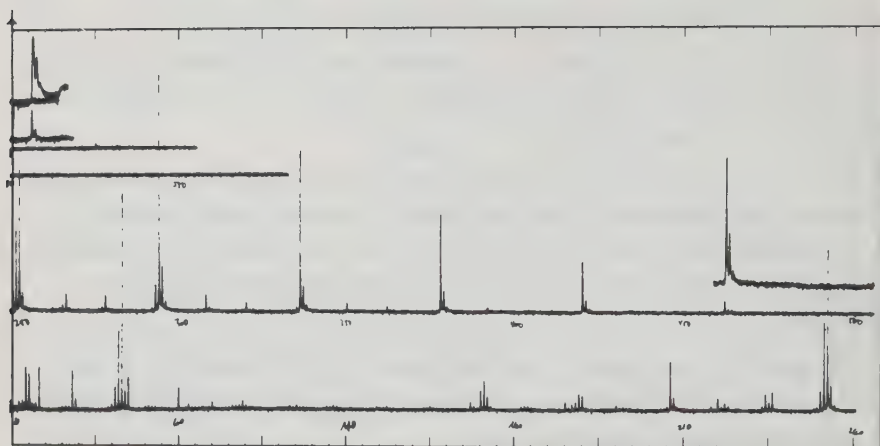


Abb.39: Massenspektrum des Hexaacetoxypyridyls
(XXX;XXXI). Elektronenenergie 70 eV,
Probentemperatur 170°, Druck $8 \cdot 10^{-6}$ Torr

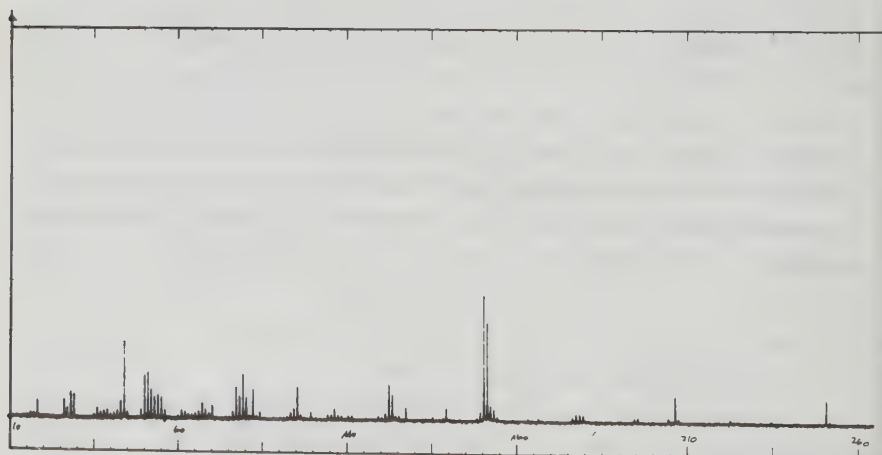
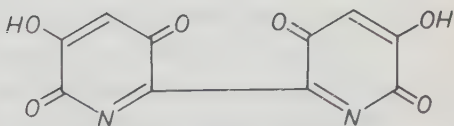
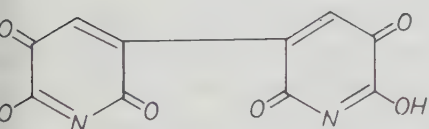
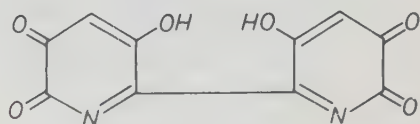
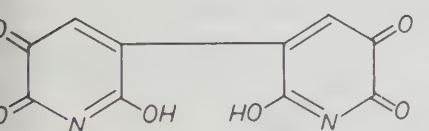


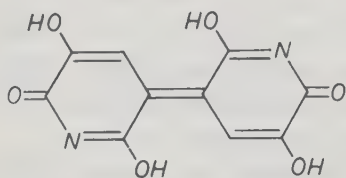
Abb.40: Massenspektrum des Oxydationsproduktes B.
Elektronenenergie 70 eV, Probentemperatur
250°, Druck $6 \cdot 10^{-6}$ Torr.

Das Massenspektrum des Oxydationsproduktes B (Abb. 40) klärt die Frage nach einer möglichen Dimerisierung bei der reduzierenden Acetylierung eindeutig. Es wird ein Molekularpeak mit der Massenzahl 250 gefunden. Diese hohe Massenzahl gibt eindeutig ein dimeres Molekül an. Gleichzeitig wird aber klar, daß die von Boyer und Kruger angegebene Formel XXVII für das von ihnen gefundene Oxydationsprodukt von 3- und 5-Aminopyridon-2 nicht stimmen kann. Es können aber auch analoge dimere Verbindungen, entsprechend den Formeln XXXII und XXXIII ausgeschlossen werden, da diese ein Molekulargewicht von 248 besitzen. Das gefundene Molekulargewicht zeigt eine um 2 Wasserstoffatome reichere Verbindung an. Hieraus ergeben sich die Diazadiphenochinonstrukturen der Formeln XXXIV und XXXV, die auch mit den gefundenen Elementaranalysenwerten (Tabelle VII) in guter Übereinstimmung sind.

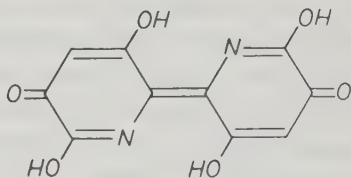


XXXII

XXXIII



XXXIV



XXXV

Sechs Tatsachen sind es, die die Formel XXXIV (2,2',5,5'-Tetrahydroxy-3,3'-diazadiphenochinon-(4,4')) oder die Formel XXXV (3,3',6,6'-Tetrahydroxy-2,2'-diazadiphenochinon-(4,4')) für das Oxydationsprodukt B stützen, wobei die Bildung der Diastereomeren mit trans-ständigem Stickstoff wegen der geringeren sterischen Behinderung bevorzugt sein sollte:

- 1) Das durch Massenspektrometrie gefundene Molekulargewicht von 250.
- 2) Das NMR-Spektrum zeigt nur das Vorhandensein von γ -Protonen an.
- 3) Die bei der Elementaranalyse gefundenen Werte stimmen mit den für die Summenformel $C_{10}H_6N_2O_6$ berechneten Werten hinreichend überein.
- 4) Beide Strukturen liefern bei der reduzierenden Acetylierung Hexaacetoxydipyridyl der Summenformel $C_{22}H_{20}N_2O_{12}$. Die für diese Formel berechneten Werte stimmen mit den bei der Elementaranalyse gefundenen Werten gut überein. Durch Acetylgruppenbestimmung wurden 6 Acetylgruppen nachgewiesen. Das Ergebnis wird durch das NMR-Spektrum (Abb. 41) bestätigt.
- 5) Eine Erklärung findet das durch Acetylierung des Oxydationsproduktes B erhaltene orangefarbene Produkt, welches wegen seiner schlechten Lösungseigenschaften nicht gereinigt werden konnte. Die Acetylgruppenbestimmung für dieses Produkt ergab 27,60% (berechnet für $C_{14}H_{10}N_2O_8$: 25,75%)

Acetyl). Es lassen sich also nur 2 Hydroxylgruppen nach dem üblichen Verfahren acetylieren. Das IR-Spektrum (Abb. 41) zeigt neben der Carbonylbande der Estergruppe noch eine Bande bei 1697 cm^{-1} , die den Carbonylgruppen des Diazadiphenochinons zugeordnet werden müßte. Freie OH- oder NH-Valenzschwingungen sind ebenfalls noch zu beobachten.

- 6) Diphenochinone sind als Oxydationsprodukte von Phenolen bei der Oxydation mit Peroxidase/ H_2O_2 beschrieben worden (62).

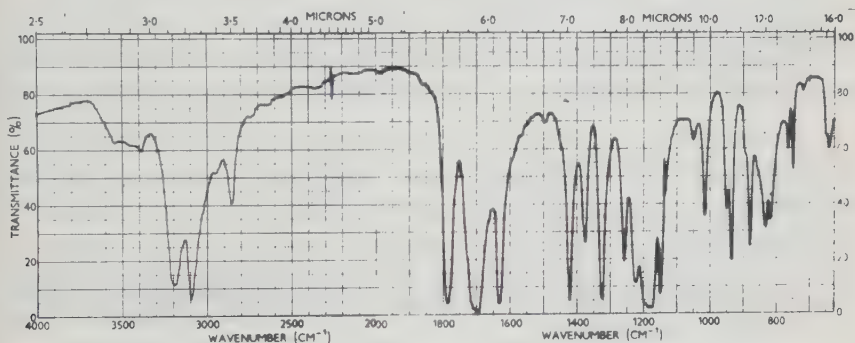


Abb.41: IR-Spektrum des diacetylierten Oxydationsproduktes B in KBr. Wellenzahlbereich $625\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$.

III Diskussion der Versuchsergebnisse

Die Reaktionen von Aminen und Phenolen mit dem System Peroxidase/ H_2O_2 sind bisher Gegenstand vieler Untersuchungen gewesen. In einigen Fällen konnten die Oxydationsprodukte isoliert und die Struktur aufgeklärt werden. Dabei zeigten sich auffälligerweise bei den Oxydationsprodukten von Phenolen einige Gruppen, die die gleichen Strukturmerkmale aufweisen:

- 1) Es bilden sich aus den Phenolen unter C-C-Verknüpfung di- und trimere Moleküle, wobei die Verknüpfung, auch bei nicht besetzter para-Stellung, vorzugsweise über die ortho-Stellung zur phenolischen OH-Gruppe erfolgt. Bei besetzter ortho-Stellung findet die Verknüpfung in para-Stellung statt.
- 2) Durochinon (VI) wird als Nebenprodukt bei der Oxydation von Durenol (IV) gebildet, wobei eine Hydroxylierung in p-Stellung angenommen werden muß. Hydrochinon (VII) wird zum para-Benzochinon (VIII) oxydiert.
- 3) 2,6-Dimethylphenol wird zum 3,3',5,5'-Tetramethyldiphenol-4,4'-chinon oxydiert.

Ebenfalls ein Diphenol-4,4'-chinon wird als Farbstoffkomponente des bei der Oxydation von Guajakol mit Peroxidase/ H_2O_2 entstehenden Stoffgemisches angegeben.

Wie schon im einleitenden Teil gesagt wurde, sollten die Untersuchungen zeigen, ob Pyridinole und Pyridindiole mit dem System Peroxidase/ H_2O_2 reagieren und ob Oxydationsprodukte zu finden sind, die in eine der drei beschriebenen Gruppen passen.

Die Fragestellung war deshalb so interessant, weil bei den Pyridinolen und Pyridindiolen die Hydroxylgruppen an einen Heterocyclus gebunden sind, der ein π -Elektronenmangelsystem darstellt.

Obwohl bis heute noch kein allgemeingültiger Mechanismus der Peroxidase-Katalyse gegeben werden konnte, hat es nicht,

durch viele Beobachtungen gestützt, an Versuchen gefehlt, Teilmechanismen auszuarbeiten, die meistens nur für eine spezielle Reaktion Gültigkeit besitzen. Die wichtigsten sollen kurz genannt werden:

Nach SAUNDERS und MANN (57) wird die durch Peroxidase katalysierte Oxydation durch Bildung freier Radikale eingeleitet, die dann in einer nichtfermentativen Reaktion weiterreagieren. Ob die Bildung der freien Radikale mit der Abspaltung eines Protons beginnt, der dann der Entzug eines Elektrons folgt oder in umgekehrter Reihenfolge ist noch nicht geklärt. In einer späteren Arbeit wird von SAUNDERS und WATSON (58) die Bildung eines aktivierten Komplexes aus Substrat, Wasserstoffperoxid und Peroxidase angenommen. Dieser Komplex würde Hydroxylierungsreaktionen ohne das Vorhandensein von Hydroxylradikalen erklären.

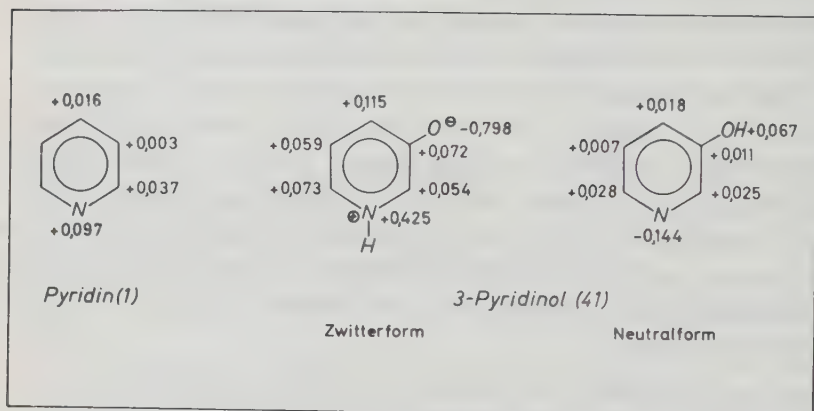
NAYLOR und SAUNDERS (50) sehen schließlich die Bildung von π -Komplexen, die durch Abspaltung eines H-Atoms aus dem Substrat und die Anlagerung eines OH-Radikals entstehen, als einleitenden Schritt für die Oxydation der Phenole an. Diese OH-Radikale sind als nicht frei zu betrachten, denn es ist nachgewiesen worden, daß freie Hydroxylradikale bei der fermentativen Oxydation keine Rolle spielen (55).

Die in dieser Arbeit vorliegenden Untersuchungen haben gezeigt, daß die Pyridinole keine Reaktion unter den beschriebenen Bedingungen mit dem System Peroxidase/ H_2O_2 zeigen. Diese Ergebnisse können folgendermaßen gedeutet werden:

Nimmt man als Einleitung der fermentativen Oxydation die Abspaltung eines Protons an, so sollte dieser Schritt zumindest beim 3-Pyridinol möglich sein, da dieses durch die phenolische OH-Gruppe einen p_{K_S} -Wert von 8,72 besitzt und damit saurer als das zur Reaktion befähigte p-Kresol ist. 2- und 4-Pyridinol liegen, wie gezeigt wurde, überwiegend in der Pyridonform vor und sind damit wesentlich schwächer sauer als das 3-Pyridinol.

Nimmt man als einleitenden Schritt einer fermentativen Oxydation mit Peroxidase/ H_2O_2 einen 1e-Entzug an, so haben die Versuche gezeigt, daß ein solcher in einem π -Elektronenmangel-

system mit einem Hydroxylsubstituenten nicht möglich ist. Die Ladungsverteilung im Pyridinmolekül und im 3-Pyridinol soll den π -Elektronenmangel deutlich machen.



Eine Inhibition der Peroxidase durch die Pyridinole selbst konnte durch folgenden Versuch ausgeschlossen werden: Wie auf Seite 26 beschrieben, entsteht bei der Oxydation des 2,5-Pyridindiol's ein Farbstoffgemisch, welches sich bei der spektrophotometrischen Untersuchung durch ein Maximum bei 513 nm auszeichnet. Mißt man die Zunahme des Maximums in Abhängigkeit von der Zeit, so erhält man eine Kurve, die den Kurven welche in Abb. 17 gezeigt werden entspricht. Bei konstanter Konzentration von 2,5-Pyridindiol, Wasserstoffperoxid und Peroxidase müßte bei einer Inhibition durch die Pyridinole keine oder eine langsame Reaktion eintreten, wodurch eine Änderung des Kurvenverlaufs zu beobachten wäre. Eine solche Änderung wurde nach Zugabe der 10fachen Pyridinolvmenge im Vergleich zum 2,5-Pyridindiol bei allen drei Pyridinolen nicht beobachtet.

Führt man dem π -Elektronenmangelsystem einen Elektronendonator zu, so scheint der Entzug eines Elektrons erleichtert. Eine solche Erleichterung scheint durch die Einführung einer

zweiten Hydroxylgruppe erreicht worden zu sein. Wie die Ergebnisse zeigten, reagieren die Pyridindiole, mit Ausnahme des 2,4-Pyridindiol, wofür durch die angestellten Untersuchungen keine Erklärung gegeben werden kann, mit dem System Peroxidase/ H_2O_2 .

Die Möglichkeit einer Inhibition der Peroxidase durch das 2,4-Pyridindiol konnte auf die oben geschilderte Weise ausgeschlossen werden.

Auch die erschwerte Abspaltbarkeit eines Protons dürfte nicht der Hinderungsgrund für eine Reaktion sein, da das 2,4-Pyridindiol einen p_{Ks} -Wert von 6,5 besitzt und somit saurer als das 2,5-Pyridindiol mit einem p_{Ks} -Wert von 8,51 ist (s. S. 5).

Bemerkenswert aber ist die Tatsache, daß das 2,4-Pyridindiol keine OH-Gruppe am β -C-Atom besitzt, welches am ehesten in der Lage ist, ein Elektron abzugeben. Das zeigt sich darin, daß alle Pyridindiole, die eine OH-Gruppe in β -Stellung aufweisen, eine Reaktion mit dem System Peroxidase/ H_2O_2 zeigen. Dabei reagieren das 3,4-Pyridindiol und das 3,5-Pyridindiol erst bei einer höheren Fermentkonzentration (1 mg Peroxidase).

Das 2,6-Pyridindiol, welches sich als sehr empfindlich gegen Luftsauerstoff und Wasserstoffperoxid gezeigt hat, wobei die Stabilität gegen Oxydationsmittel in den sauren Lösungen ($p_H 3$ und $p_H 5$) größer war als in neutraler Lösung, zeigte durch Fermentzusatz eine Beschleunigung der Reaktionsgeschwindigkeit.

Eingehender wurde die fermentative Oxydation des 2,5-Pyridindiol untersucht.

Besonders den Oxydationszwischenprodukten wurde Aufmerksamkeit geschenkt.

Wie aus den Untersuchungen hervorgeht, wurde die maximale Konzentration der Zwischenprodukte, die sich durch ein Maximum bei 513 nm zu erkennen geben, mit 3 Oxydationsäquivalenten bei $p_H 5$ und mit 2 Oxydationsäquivalenten bei $p_H 7$ erreicht. Eine höhere H_2O_2 -Konzentration führte zu einer

schnellen Abnahme der Extinktion im Maximum unter Bildung der Oxydationsendprodukte, die nicht näher untersucht wurden.

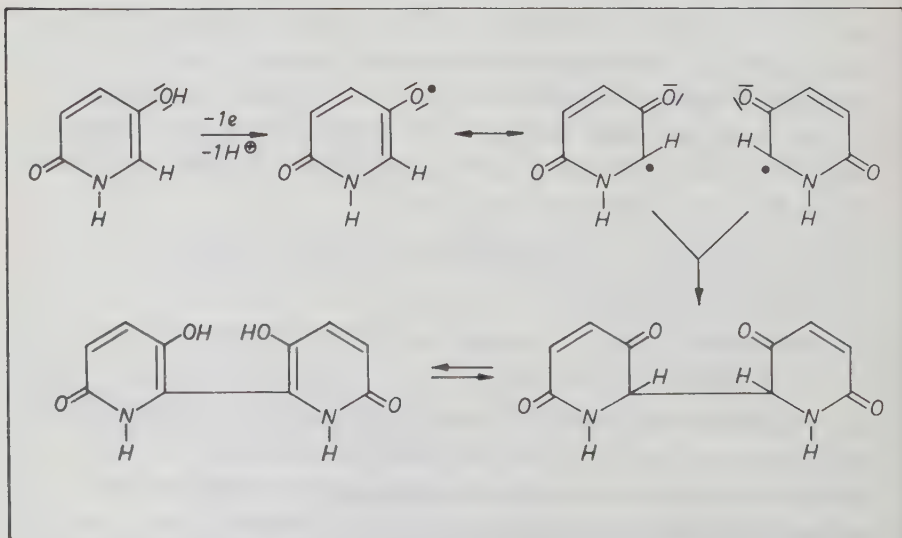
Die Reaktionsgeschwindigkeit zur Bildung der Oxydationszwischenprodukte ist bei $p_H 7$ gegenüber $p_H 5$ erhöht, ebenso wie die Konzentration der Oxydationszwischenprodukte, was man an der höheren Extinktion im Maximum 513 nm ablesen kann.

Bei der fermentativen Oxydation müssen 2 Reaktionsschritte voneinander unterschieden werden:

- 1) Die fermentativ katalysierte Reaktion des H-Donators mit dem System Peroxidase/ H_2O_2 und
- 2) die nicht fermentativ gesteuerte Folgereaktion, an die sich weitere Fermentreaktionen anschließen können.

Nach Saunders und Mann (s. oben) werden zunächst durch fermentative Dehydrierung Radikale gebildet, die dann sehr schnell weiterreagieren.

Das Reaktionsschema für das gefundene Oxydationsprodukt A (5,5'-Dihydroxy-6,6'-dipyridyl-2,2'(1,1'H)-dion) (XXIV) sollte danach folgendermaßen aussehen:



Unter Entzug eines Elektrons und Abspaltung eines Protons entsteht ein reaktionsfähiges Radikal, welches aus einer anderen mesomeren Grenzstruktur heraus mit einem zweiten Radikal unter C-C-Verknüpfung reagieren kann. Das entstandene Molekül steht in einem tautomeren Gleichgewicht mit dem zurückgebildeten, jetzt dimeren, Phenol.

Das Oxydationsprodukt B stellt nach den vorliegenden Untersuchungen das 2,2',5,5'-Tetrahydroxy-3,3'-diazadiphenochinon-(4,4') (XXXII) oder das 3,3',6,6'-Tetrahydroxy-2,2'-diazadiphenochinon-(4,4') (XXXIII) dar. Mit Sicherheit ist es nicht das nach Kudernatsch erwartete p-Pyridinchinon und nicht das von Boyer und Kruger postulierte 6-Hydroxy-p-pyridinchinon (XXVII), da durch Massenspektrometrie eindeutig ein Molekulargewicht von 250 ermittelt wurde. Durch reduzierende Acetylierung wurde ein Hexaacetoxydipyridyl erhalten, wodurch 6 Sauerstofffunktionen im Molekül angezeigt werden. Die sowohl beim 2,2',5,5'-Tetraacetoxy-6,6'-dipyridyl (XXII) (acetyliertes Oxydationsprodukt A) als auch beim Hexaacetoxydipyridyl (reduzierend acetyliertes Oxydationsprodukt B) getrennt auftretenden Methylprotonensignale der Acetoxygruppen in α - und β -Stellung, fallen beim monomeren Molekül (2,5-Diacetoxypyridin) zusammen. Auch die Signale der Methylprotonen von 2-Acetoxypyridin und 3-Acetoxypyridin fallen zusammen. Dadurch ist eine Stellungszuordnung für die Acetoxygruppen beim Hexaacetoxydipyridyl nicht zu treffen. Die Frage, an welcher Stelle Hydroxylierung und Dimerisierung stattgefunden haben, muß daher offen bleiben. Ringprotonen in den γ -Stellungen des Moleküls sind durch NMR-Spektren bewiesen worden.

Als Diazadiphenochinon gehört das Oxydationsprodukt B in die 3. Gruppe der Oxydationsprodukte von Phenolen (s. S.72). Überraschenderweise ist bei der fermentativen Oxydation des 2,5-Pyridindiols eine Hydroxylierung zu beobachten, die bei den Phenolen in der gleichen Art nicht zu beobachten ist.

Nicht unerwähnt bleiben darf, daß von dem erhaltenen Tetrahydroxydiazadiphenochinon, gleich ob der Struktur XXXII oder XXXIII zugeordnet, Diastereomere existieren können. Boyer

und Kruger geben für das von ihnen aus 3- bzw. 5-Aminopyridon-2 erhaltene Oxydationsprodukt (XXVII) an, daß es durch Soxhletextraktion mit Äthanol in 2 Fraktionen getrennt werden kann, eine äthanollösliche und eine äthanolunlösliche, die beide bei der reduzierenden Acetylierung das Hexaacetoxypyridyl ergeben. Ob es sich dabei um die Diastereomeren handelt oder ob das in der vorliegenden Arbeit beschriebene Oxydationsprodukt C, welches sich bei der chromatographischen Untersuchung durch den Rf-Wert 0 auszeichnet, das fehlende Diastereomere darstellt, wurde nicht untersucht.

IV

EXPERIMENTELLER TEIL

Allgemeine Angaben

Lösungsmittel

Wasser.

Das für die spektrophotometrischen Messungen und für die Versuchsansätze verwendete Wasser wurde über einen Mischbettionenaustauscher demineralisiert und anschließend in einer Hereus-Quarz-Apparatur bidestilliert.

Aethylacetat.

Das für die Ausschüttelung der Oxydationsprodukte verwendete Aethylacetat war ein Handelsprodukt und wurde nicht weiter gereinigt.

Dimethylformamid.

Das für säulenchromatographische Zwecke verwendete Dimethylformamid war ein Handelsprodukt. Für spektrophotometrische Zwecke wurde es nach PESTEMER (52) gereinigt.

Chloroform, Aceton und Aethanol.

Für die Molekulargewichtsbestimmungen wurden p.a. Chemikalien verwendet.

Chloroform für spektrophotometrische Messungen wurde über eine Säule mit bas. Aluminiumoxid gereinigt,

Aethanol für die gleichen Messungen nach PESTEMER (52).

Zum Umkristallisieren wurden stets einfache Handelsprodukte verwendet.

Schmelzpunktsbestimmung.

Die Bestimmung der Schmelzpunkte bis 300° erfolgte in dem automatischen Schmelzpunktbestimmungsgerät FPl der Firma Mettler. Die Schmelzpunkte oberhalb 300° wurden im Linström-Block erhalten.

Es handelt sich um unkorrigierte Werte.

Trocknung.

Die Trocknung der Substanzen wurde, soweit nicht anderes angegeben ist, in der Trockenpistole über P_2O_5 bei $60^{\circ}/20$ mm Hg (Wasserstrahlvakuum) vorgenommen.

Temperatur.

Die Temperaturangaben in $^{\circ}$ (Grad) verstehen sich als Grad Celsius.

Elementaranalysen.

Die C- und H-Bestimmungen wurden im Mikroanalytischen Labor A. Bernhardt, Mühlheim/Ruhr und im Mikroanalytischen Labor I. Beetz, Kronach/Ofr., durchgeführt.

Acetyl- und Benzoylgruppenbestimmungen im erstgenannten Labor. Die N-Bestimmungen wurden mit einem Coleman Nitrogen Analyzer vorgenommen.

Molekulargewichtsbestimmungen.

Die Bestimmung der Molekulargewichte erfolgte in Dampfdruckosmometern.

Erfolgte die Messung in Aceton, so wurde bei 37° im Dampfdruckosmometer 301 A der Firma Mechrolab Inc., Mountain View, Calif. gearbeitet. Wurde in Chloroform gemessen, so wurde in einem Gerät der Firma Knauer, Berlin, ebenfalls bei 37° gearbeitet. Die Lösungsmittel werden bei den einzelnen Molekulargewichten angegeben.

UV-Spektren.

Die Spektren im Bereich von 220-800 nm wurden im Spektralphoto-

tometer der Firma Carl Zeiss, Modell PMQ II aufgenommen. Zur Bestimmung des zeitlichen Verlaufs von Reaktionen (Kinetik) wurde vorwiegend in einem selbstregistrierenden Gerät der Firma Beckman, Modell DK-1A gearbeitet.

Als Küvetten wurden solche aus Quarzglas verwendet, mit einer Schichtdicke von 1,000 cm.

Die Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

IR-Spektren.

Die Spektren im infraroten Bereich von 2,5-16 μ wurden mit einem Perkin-Elmer-Spektralphotometer, Modell 237 E aufgenommen. Die Aufnahmen wurden mit einem KBr-Pressling durchgeführt.

NMR-Spektren.

Die Aufnahmen der Kernresonanzspektren wurden mit einem Varian-A-60A-Gerät aufgenommen.

Die Lösungsmittel werden bei den einzelnen Spektren angegeben.

Das pentadeuterierte Pyridin mit einem Mindestgehalt von 99% Deuteroverbindung wurde von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen.

Massenspektren.

Die Massenspektren wurden in einem Gerät der Firma Varian, Modell M66 aufgenommen.

Gefriertrocknung.

Zur Lyophilisation wurde ein Gerät der Firma M. Christ, Osterode/Harz, benutzt.

In einem Arbeitsgang wurden jeweils 5 Versuchsansätze auf -30° gekühlt und das Lösungsmittel im Vakuum entzogen.

Die Temperatur der Verdampferschalen stieg dabei nicht über 20° an.

Spezielle Angaben

Ferment.

Für die Untersuchung der fermentativen Oxydation wurde Meerrettichperoxidase benutzt. Dieses Ferment stellt ein gereinigtes Trockenpräparat dar, welches von der Firma C.F.Boehringer & Söhne GmbH, Mannheim, bezogen wurde. Die Aktivität des Fermentes wurde nach der Methode von CHANCE und MAEHLY (19) bestimmt.

Bei der Einwirkung des Systems Peroxidase/ H_2O_2 auf Guajakol kommt es zur Bildung eines farbigen Oxydationsproduktgemisches, welches ein Maximum bei 470 nm hat. Die Erhöhung der Extinktion in diesem Maximum wird in Abhängigkeit von der Zeit gemessen, woraus sich die Fermentkonzentration des Handelsproduktes berechnen läßt, da die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion bekannt ist. Es müssen bestimmte Konzentrationen des Guajakols und des Wasserstoffperoxids verwendet werden.

Das Produkt enthielt $4,2 \cdot 10^{-9}$ Mol/mg reine Peroxidase. Für die fermentative Oxydation wurde von dieser Trockensubstanz eine Stammlösung von 1 mg/ml hergestellt und zu den Versuchsansätzen jeweils die der Milligrammenge entsprechende Millilitermenge zugesetzt. Die Peroxidasetrockensubstanz wurde im Kühlschrank gelagert.

Wasserstoffperoxid.

Aus einer 30%igen "Perhydrollösung Merck" wurde eine 0,1 N-Wasserstoffperoxidlösung hergestellt und der Gehalt der Lösung durch permanganometrische Titration bestimmt. Die Lösung wurde im Kühlschrank in einer braunen Glasflasche aufbewahrt und der H_2O_2 -Gehalt regelmäßig überprüft. Gegebenenfalls wurde die Lösung frisch bereitet. Die für die fermentative Oxydation benötigten Mengen wurden dieser Stammlösung entnommen und auf die erforderliche Konzentration mit Wasser verdünnt.

Die Angabe der Konzentrationen erfolgt in Oxydationsäquivalenten (Oxval), wobei einem Oxval H_2O_2 ein Mol Substrat äquivalent sein soll, was einem 1e-Übergang vom Substrat auf

das Oxydationsmittel entspricht.

Pufferstammlösungen.

Für den Puffer $p_H 3$ wurde eine Citrat-Salzsäure-Pufferstammlösung nach SÖRENSEN (20), für den Puffer $p_H 5$ eine Essigsäure-Acetat-Pufferstammlösung nach MICHAELIS (63) und für den Puffer $p_H 7$ eine Citronensäure-Phosphat-Pufferstammlösung nach Mc.ILVAINE (20) hergestellt.

Die p_H -Werte wurden mit der Glaselektrode überprüft, wobei auf eine Genauigkeit von $\pm 0,05$ p_H -Einheiten eingestellt wurde.

Herstellung der Pyridinole und Pyridindiole.

Die 3 Pyridinole wurden von der Firma Fluka AG, Chemische Fabrik, Buchs SG/Schweiz käuflich erworben und durch Umkristallisieren aus geeigneten Lösungsmitteln gereinigt.

2-Pyridinol (XI) purum, von der Firma angegebener Schmelzpunkt $102-105^\circ$, wurde aus Benzol umkristallisiert.

Die erhaltenen farblosen Kristalle hatten nach 2stündigem Trocknen einen Schmelzpunkt von $107,3^\circ$.

Literaturschmelzpunkt: 107° (Beilsteinzitat XXI 43).

3-Pyridinol (XII) purum, von der Firma angegebener Schmelzpunkt $126-129^\circ$, wurde ebenfalls aus Benzol umkristallisiert.

Die erhaltenen farblosen Nadeln hatten nach 2stündigem Trocknen einen Schmelzpunkt von $126,4^\circ$.

Literaturschmelzpunkt: 126° (Beilsteinzitat XXI 46).

Wegen der starken Abhängigkeit der Extinktionskurven vom p_H -Wert der wässrigen Lösung wurde der molare Extinktionskoeffizient in Aethanol bestimmt (siehe Tabelle VIII).

4-Pyridinol (XIII) prakt., angegebener Schmelzpunkt $138-143^\circ$, wurde aus Wasser umkristallisiert, nachdem die wässrige Lösung einige Minuten mit Tierkohle gekocht und filtriert worden war.

Es wurden farblose Kristalltafeln erhalten, die nach dem Trocknen einen Schmelzpunkt von $148,4^\circ$ aufwiesen.

Literaturschmelzpunkt: $148,5^\circ$ (Beilsteinzitat XXI 48).

2,3-Pyridindiol (XIV) wurde nach der Methode von v. SCHICKH, BINZ und SCHULZ (59) hergestellt.

Dabei geht man von 3-Pyridinol aus und jodiert bei Zimmertemperatur mit Jod-Jodkalium in sodaalkalischer Lösung.

Man erhält auf diese Weise leicht das 2-Jod-3-hydroxypyridin, welches nach Lösen in 10%iger NaOH und Ausfällen mit SO_2 aus Benzol umkristallisiert wurde. Es bildete farblose Schuppen vom Literaturschmelzpunkt 192° .

Dieses Produkt wurde im Einschmelzrohr mit Natriummethylat 10 Stunden auf 150° erhitzt und das entstandene sehr unsaubere 2-Methoxy-3-hydroxypyridin im Vakuum destilliert.

Nach dem Umkristallisieren aus Benzol wurden leicht gelbliche Kristalle von Literaturschmelzpunkt 76° erhalten.

Im letzten Schritt wurde dieses Produkt 5 Stunden mit 40%iger Bromwasserstoffsäure unter Rückfluß zum Sieden erhitzt und danach im Vakuum destilliert.

Der Rückstand ergab nach mehrmaligem Umkristallisieren aus wenig heißem Wasser farblose Nadeln, welche nach dem Trocknen einen Zersetzungspunkt von $251,5^\circ$ aufwiesen.

Literatur: 248° Z. (59). $247-248^\circ$ Z. (21).

2,4-Pyridindiol (XV) wurde nach ERRERA (23) hergestellt.

Acetondicarbonsäurediäthylester, Essigsäureanhydrid und Orthoameisensäureester wurden zusammen unter Rückfluß 1 Stunde gekocht und danach alles unterhalb 120° Siedende abdestilliert. Der Rückstand wurde mit konz. NH_4OH versetzt, und nach Lösen des Rückstandes erstarrte die Lösung bald zu einem dicken Brei, der nach Trennung von der Mutterlauge angesäuert wurde.

Der verbleibende rötliche Niederschlag wurde aus Aethanol umkristallisiert. Man erhielt farblose Nadeln von 2,4-Pyridindiol-5-carbonsäureäthylester mit dem Zersetzungspunkt von 213° .

Der Ester wurde im Einschlußrohr mit konz. HCl bei 160° verseift und anschließend nach kurzzeitigem Öffnen des Bombenrohres und erneutem Erhitzen auf 200° decarboxyliert.

Der sirupöse Rückstand wurde mit wenig Wasser aufgenommen und mit NH_4OH genau neutralisiert. Das 2,4-Pyridindiol schied

sich als farbloses, sandiges Pulver ab und hatte nach dem Umkristallisieren aus Wasser und Trocknen einen Zersetzungspunkt von $272,5^{\circ}$. Literatur: $271,5-272,5^{\circ}$ Z (21).

2,5-Pyridindiol (XVI) wurde nach BEHRMANN und PITT (9) in Anlehnung an die Elbs-Persulfatoxydation erhalten. Ausgehend vom 2-Pyridinol wurde in stark natronalkalischer Lösung bei 5° unter Zusatz von Eisen-II-sulfat mit Kaliumperoxydisulfat über 20 Stunden oxydiert. Der entstandene Ester wurde nach Abfiltrieren des Eisenhydroxyds bei p_H 0,75 unter Stickstoff bei 100° in 30 Minuten verseift. Das Hydrolysat wurde mit Natronlauge auf p_H 6,5 gebracht und die Lösung im Umlaufverdampfer zur Trockne eingedampft. Das erhaltene dunkelbraune Pulver wurde weiter über P_2O_5 getrocknet.

Das 2,5-Pyridindiol, welches als Hauptprodukt neben wenig 2,3-Pyridindiol entsteht, wurde im Soxhlet-Apparat mit Isopropanol ausgezogen. Der Isopropanolauszug wurde bis zur beginnenden Kristallisation im Umlaufverdampfer eingeengt und bei -10° über Nacht stehengelassen.

Das auskristallisierte Produkt bestand zum überwiegenden Teil aus unreinem 2,5-Pyridindiol. Die Rohausbeute betrug etwa 35-40%. Zur Reinigung wurde aus heißem Wasser unter Verwendung von Tierkohle umkristallisiert. Man erhielt bei sorgfältigem Arbeiten farblose, watteartige Kristalle, die sich nach dem Trocknen bei 220° zersetzten. Literatur: Zersetzung zwischen $225-235^{\circ}$ (21).

Die Ausbeute an gereinigtem Produkt betrug etwa 10-20% der Theorie.

Das 2,5-Diacetoxypyridin (XXI) wurde nach DEN HERTOOG, WIBAUT, SCHEPMAN und VAN DER WAL (21) hergestellt.

Dazu wurde 2,5-Pyridindiol mit einem Überschuß von Acetanhydrid einige Minuten erwärmt und das Reaktionsgemisch im Vakuumexsikkator über NaOH getrocknet. Das Kristallisationsprodukt wurde aus Äthylacetat umkristallisiert.

Das Diacetat bildet farblose Kristalle, die nach dem Trocknen in der Trockenpistole bei $40^{\circ}/20$ mm Hg über P_2O_5 einen Schmelzpunkt von 68° zeigten. Literatur: 68° (21).

2,5-Dibenzoxypyridin (XX)

200 mg 2,5-Pyridindiol wurden in 2 ml Pyridin und 5 ml Chloroform gelöst und zu der Lösung vorsichtig 0,5 ml Benzoylchlorid gegeben.

Die Lösung blieb 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen und wurde danach in 100 ml 1%ige Schwefelsäure gegeben. Das 2,5-Dibenzoylpyridin wurde mit Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroformphase wurde eingedampft und der Rückstand aus Äthanol umkristallisiert.

Es wurden farblose Kristalle erhalten, die nach dem Trocknen einen Schmelzpunkt von 123° besaßen.

Ausbeute: 575 mg (= 71% der Theorie).

2,6-Pyridindiol (XVII) wurde von der Firma Dr. Theodor Schuchardt GmbH & Co., München, bezogen. Es handelte sich um eine braune, kristalline Substanz, die durch Umkristallisation aus heißem Wasser mit Hilfe von Tierkohle gereinigt wurde. Es wurden fast farblose Kristallnadeln erhalten, die nach dem Trocknen einen Zersetzungspunkt von $182,5^{\circ}$ hatten. Literatur: $184-185^{\circ}$ Z. (21). Im Linströmblock wurde ein Zersetzungspunkt von 185° gefunden.

3,4-Pyridindiol (XVIII) wurde aus der Mekonsäure über die Komenaminsäure hergestellt. Dieser Syntheseweg wurde von HOW (32) beschrieben.

Hier wurde nach einem vereinfachten Verfahren von BELONOSOW (10) gearbeitet.

Von unreiner Meconsäure ausgehend, wurde zuerst durch Kochen mit konz. Salzsäure unter Rückfluß die Komensäure hergestellt. Es wurde durch Eingießen in Wasser ein fast farbloses Kristallpulver erhalten, welches sofort weiterverarbeitet wurde. Dazu wurde es 6 Stunden mit konz. NH_4OH unter Rückfluß gekocht und anschließend in einer offenen Porzellanschale erhitzt, bis kein Ammoniak mehr entwich. Der tief rotbraun gefärbte Rückstand wurde mit heißem Wasser aufgenommen, filtriert und nach Ansäuern mit HCl fiel die 3,4-Pyridindiol-6-carbonsäure (Komenaminsäure) aus. Diese wurde im Ölbad solange auf 270° erhitzt, bis keine CO_2 -Entwicklung mehr

stattfand. Nach dem Reinigen des erkalteten Rückstandes durch Kochen der wässerigen Lösung mit Tierkohle und Umkristallisation aus Wasser, erhielt man farblose Kristallblättchen, welche nach dem Trocknen einen Zersetzungspunkt von $241,2^{\circ}$ aufwiesen. Literatur: $240-241^{\circ}$ Z. (21)

3,5-Pyridindiol (IXX) wurde nach einer von MACHEK (44) verbesserten Methode von HOFFMANN und KÖNIGS (29) erhalten.

Dabei destilliert man aus einer Retorte das Gemisch von 1 Teil Piperidin und 10 Teilen stärkstem Oleum solange, bis der Rückstand fast fest geworden ist.

Dieser wurde in Wasser gelöst und die saure Lösung mit BaCO_3 im Überschuß versetzt. Nach kurzem Aufkochen wurde nach Beendigung der CO_2 -Entwicklung filtriert und das Filtrat mit Tierkohle gekocht. Nach nochmaliger Filtration wurde die farblose Lösung eingeeengt und das Ba-Salz der 3,5-Pyridindisulfonsäure kristallisierte aus.

Dieses wurde in Wasser gelöst und mit der stöchiometrischen Menge Schwefelsäure zerlegt. Es wurde vom BaSO_4 abfiltriert und abermals eingeeengt.

Im Kühlschrank kristallisierte aus der Lösung die 3,5-Pyridindisulfonsäure aus.

Diese wurde nach KÖNIGS und GEIGY (37) mit der 4-fachen Menge Ätzkali und wenig Wasser in einem Nickeltiegel geschmolzen, bis die Masse eine grüngelbe Farbe zeigte und eine angesäuerte Probe keinen Geruch nach schwefliger Säure mehr zeigte. Die Schmelze wurde in Wasser gelöst und mit Schwefelsäure neutralisiert.

Es fiel ein Niederschlag von 3,5-Pyridindiol aus, der durch mehrmaliges Umkristallisieren aus heißem Wasser gereinigt wurde.

Das so gewonnene 3,5-Pyridindiol bildete feine, leicht grünlige Nadeln, die getrocknet einen Zersetzungspunkt von $250,1^{\circ}$ aufwiesen. Literatur: $252-253^{\circ}$ Z. (21).

Die Tabelle VIII zeigt die gefundenen molaren Extinktionskoeffizienten im Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen Werten.

	Lösungsmittel	$\lambda_{\text{Max.}}$ [nm]	$\log \epsilon$ [L/Mol. cm]
2-Pyridinol	H ₂ O / p _H 5,85 (H ₂ O / p _H 6)(46)	224 (224) 295 (293)	3,88 (3,86) 3,77 (3,77)
3-Pyridinol	Aethanol (Aethanol) (46) (47)	218 (215) 279 (279)	3,75 (3,81) 3,61 (3,65)
4-Pyridinol	H ₂ O / p _H 5,85 (H ₂ O) (13)	255 (260)	4,19 (4,2)
2,3-Pyridindiol	H ₂ O / p _H 5,85 (H ₂ O) (21)	297 (295) 234 (230)	3,88 (3,8) 3,65 (3,6)
2,4-Pyridindiol		274 (270)	3,70 (3,8)
2,5-Pyridindiol		320 (320) 230 (230)	3,73 (3,7) 3,85 (3,8)
2,6-Pyridindiol		314 (320) 230 (235)	3,96 (4,1) 3,84 (3,8)
3,4-Pyridindiol		273 (275) 212 (215)	4,10 (4,1) 4,29 (4,2)
3,5-Pyridindiol		312 (---) 290 (280) 222 (220)	3,50 (---) 3,48 (3,8) 4,0 (3,9)

Tabelle VIII: Meßwerte in den Maxima der Absorptionsspektren der für die Untersuchungen verwendeten Pyridinole und Pyridindiole verglichen mit den in der Literatur angegebenen Werten (in Klammern).

Die gefundenen Werte stimmen mit Ausnahme der Werte für das 3,5-Pyridindiol, für dessen Reinheit nicht garantiert werden kann, gut mit den in der Literatur angegebenen Werten überein.

MACHEK (44) weist bereits auf die Schwierigkeit hin, reine.

3,5-Pyridindisulfonsäure nach dem Herstellungsverfahren aus Piperidin und Oleum zu erhalten. Es bildet sich immer ein Gemisch der Mono- und Disulfonsäuren, welches sich nur schwer trennen läßt. Durch wiederholtes Umkristallisieren aus Wasser konnte lediglich die Intensität des Maximums bei 312 nm gesteigert werden. Dünnschichtchromatographisch zeigte sich das Produkt in verschiedenen Laufmitteln einheitlich.

Versuchsansätze

Die Ansätze zur fermentativen Oxydation wurden in 100 ml Meßkolben gemacht. Die Reaktionspartner wurden aus Stammlösungen in die Kolben pipettiert.

Die Pufferstammlösungen wurden für die Versuchsansätze 1:4 mit Wasser verdünnt, wobei sie die vorgeschriebenen p_H -Werte von 3, 5 und 7 erreichten.

Während der Reaktionszeit wurden die geschlossenen Kolben unter Laborbedingungen gehalten.

Zu jedem Versuchsansatz wurde eine entsprechende Lösung jedoch ohne die zu oxydierende Substanz als Vergleichslösung für die spektrophotometrische Messung angesetzt.

Aus diesen Kolben wurden die Lösungen in die Küvetten gefüllt.

Dünnschichtchromatographie

Die dünnschichtchromatographischen Untersuchungen wurden auf Polyamid "Woelm DC"-Platten durchgeführt. Die Schichten (0,25 mm) wurden mit einem Streichgerät der Firma C.Desaga, Heidelberg, aufgetragen. Dazu wurden für 5 Platten 17,0 Gramm Polyamid Woelm DC, 1,5 Gramm Stärke und 45 ml Wasser, ggf. unter Zusatz von 2% Fluoreszenzindikator Leuchtstoff Grün Woelm, mit einem SG-Stab etwa 2 Minuten durchgerührt. Die Platten wurden luftgetrocknet verwendet. Chromatographiert wurde aufsteigend in nichtgesättigter Kammer mit den angegebenen Laufmitteln.

Präparative Gewinnung der Oxydationsprodukte A-C

Zur präparativen Gewinnung des Gemisches der Oxydationsproduk-

te wurde folgender Ansatz gemacht:

In einem großen Standzylinder wurden 222 mg (2 mMol) 2,5-Pyridindiol in 1 Liter Wasser gelöst und zu der Lösung 0,25 ml 30%iges Perhydrol Merck und 20 mg Peroxidase, gelöst in 20 ml Wasser, gegeben.

Die Lösung färbte sich sofort intensiv himbeerrot. In einigen Fällen kristallisierte aus dieser Lösung ein Teil der Oxydationsprodukte nach etwa 1 Stunde aus. Dieser Teil wurde auf einer Glasfilternutsche gesammelt.

Aus der Lösung konnte dann nach weiteren 6 Stunden eine zweite Kristallfraktion erhalten werden.

Unterblieb die fraktionierte Kristallisation, so wurde nach 12 Stunden das gesamte Kristallinat durch Abnutschen gewonnen. Nach dem Trocknen blieben 188 mg eines tief violett-roten, metallisch glänzenden Kristallpulvers.

Säulenchromatographische Gewinnung des Oxydationsproduktes A (XXIV)

Die Trennung der Oxydationsprodukte aus 2,5-Pyridindiol wurde auf einer Polyamid "Woelm DC"-Säule vorgenommen. Dazu wurde eine Glassäule von 10 cm Durchmesser, die mit einem Hahn verschlossen war, mit einer gut gießbaren Aufschlammung von Polyamid "Woelm DC" in Aceton beschickt, bis die Schicht nach dem Abfließen des Acetons etwa 10 cm hoch war. Die Säule wurde mit einem Zelluloserundfilter abgedeckt und pro Säulenfüllung etwa 50 mg des Gemisches der Oxydationsprodukte, in Dimethylformamid gelöst, aufgegeben.

Nach Einsickern der Lösung wurde mit Dimethylformamid eluiert, wobei zuerst das gelbe Oxydationsprodukt A von der Säule kam und in Wasser ausgefällt wurde.

Bei weiterem Eluieren ließ sich auch das Oxydationsprodukt B von der Säule bringen.

An der Oberfläche der Säule blieb ein violettetes Produkt haften.

Das mehrmals aus Dimethylformamid mit Wasser umgefällte Oxydationsprodukt A stellte ein gelbes, amorphes Pulver dar, welches sich nach dem Trocknen im Linströmblock bei 328° zersetzte.

Elementaranalyse: siehe Seite 54

Acetylierung des Oxydationsproduktes A

50 mg der Substanz wurden mit 5 ml Acetanhydrid in einem Acetylierungskölbchen unter Rückfluß gekocht, bis die rote Farbe der Lösung verschwunden war. Der Kolbeninhalt wurde auf wenig Eis gegossen und ein schmutzig weißes, festes Produkt entstand nach längerem Stehen aus öligen Tröpfchen. Nach Umkristallisieren des festen Produktes aus Isopropanol wurden weiße Kristallnadeln erhalten, die nach dem Trocknen einen Schmelzpunkt von $171,6^{\circ}$ hatten.

Ausbeute 60 mg (68% der Theorie, berechnet auf $C_{18}H_{16}N_2O_8$). UV-Maximum bei 281 nm ($\log \epsilon = 4,06$) Lösungsmittel: Chloroform.

Elementaranalyse: siehe Seite 54

Benzoylierung des Oxydationsproduktes A

50 mg der Substanz wurden mit 2 ml Pyridin und 5 ml Chloroform in einem Acetylierungskölbchen angeschüttelt und dazu vorsichtig 0,5 ml Benzoylchlorid getropft. Dabei trat eine leichte Erwärmung auf.

Nach 24stündigem Stehen bei Zimmertemperatur wurde der Kolbeninhalt in 100 ml 1%ige Schwefelsäure gegeben und mit Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroformphase wurde zur Trockne eingedampft und der Rückstand aus Aethanol umkristallisiert.

Es wurden 90 mg glänzender, farbloser Kristallnadeln erhalten, die nach der Trocknung den Schmelzpunkt $227,3^{\circ}$ aufwiesen. Ausbeute: 64% der Theorie, berechnet auf $C_{38}H_{24}N_2O_8$. UV-Maximum bei 277 nm ($\log \epsilon = 4,22$), Schulter bei 284 nm; Lösungsmittel: Chloroform.

Elementaranalyse: siehe Seite 54

Präparative Gewinnung des Oxydationsproduktes B

Da die Gewinnung dieses Oxydationsproduktes aus den fermentativen Ansätzen sehr schwierig war, wurde es auf anderem Wege präparativ gewonnen.

Dazu wurden 1,11 g (0,01 Mol) 2,5-Pyridindiol in 50 ml Aceton angeschlämmt und dazu 2,45 g (0,01 Mol) Tetrachlor-o-chinon

in 50 ml Aceton gelöst gegeben.

Das Gemisch wurde 48 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach 24 Stunden war der Ansatz gelb gefärbt und hatte nach weiteren 24 Stunden eine tiefrote Farbe angenommen.

Es hatten sich nadelförmige Kristalle abgeschieden, die abgenutscht und mit Aceton gespült von blauem metallischem Glanz waren.

Nach dem Trocknen hatten sie eine stumpfe rote Farbe angenommen und zeigten im Linströmblock Zersetzung oberhalb 300° . Die Ausbeute betrug 385 mg (32% der Theorie, berechnet auf $C_{10}H_6N_2O_6$).

Aus der Mutterlauge konnte ein zart rosa Produkt isoliert werden, welches nicht weiter gereinigt wurde und einen Schmelzpunkt von 191° hatte. Mit konz. Salpetersäure konnte es in essigsaurer Lösung zu einem roten Produkt oxydiert werden. Es handelte sich offensichtlich um Tetrachlorbrenzkatechin.

Literaturschmelzpunkt: $193-194^{\circ}$.

Elementaranalyse: siehe Seite 61

Reduzierende Acetylierung des Oxydationsproduktes B

Die reduzierende Acetylierung des Oxydationsproduktes B wurde nach der Vorschrift von BOYER und KRUGER (15) durchgeführt.

Dazu wurden 125 mg (1 mmol) des Produktes mit 500 mg Zinkstaub in 3 ml Acetanhydrid solange erhitzt, bis die Lösung schwach gelb geworden war.

Die heiße Lösung wurde filtriert und im Vakuum zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde aus Aethanol umkristallisiert. Es wurden schwach gelbe Kristalle erhalten, die nach dem Trocknen einen Schmelzpunkt von $155,3^{\circ}$ hatten.

Literaturschmelzpunkt: 159° .

Die Ausbeute betrug 188 mg (74% der Theorie, berechnet auf $C_{22}H_{20}N_2O_{12}$).

Das Produkt konnte für die NMR-Spektrometrie nicht verwendet werden, da es offenbar noch Spuren von Zinkacetat enthielt.

Um dieses zu entfernen wurde das Acetylprodukt in 5 ml Aceton

gelöst und in eine Lösung von 100 mg Äthylendiamintetraessigsäurem Natrium in 100 ml Wasser gegeben.

Die Lösung trübte sich und nach 24stündigem Stehen im Kühlschrank konnte eine cremefarbene Substanz erhalten werden, die nach dem Trocknen einen Schmelzpunkt von $156,4^{\circ}$ hatte. Das Produkt ließ sich jetzt für die NMR-Messung verwenden. UV-Maximum bei 277 nm ($\log \epsilon = 4,23$). Lösungsmittel: Chloroform.

Elementaranalyse: siehe Seite 63

V ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden Pyridinole und Pyridindiole auf ihre Reaktionsfähigkeit mit dem System Peroxidase/ H_2O_2 untersucht. Die Untersuchungen wurden bei $p_H 3$, $p_H 5$ und $p_H 7$ spektrophotometrisch und bei den Pyridinolen daneben auch auf chromatographischem Wege durchgeführt.

Dabei hat sich gezeigt, daß die Pyridinole sowie das 2,4-Pyridindiol unter den angegebenen Bedingungen nicht reagieren. Die möglichen Gründe dafür wurden diskutiert. Eine Inhibition der Peroxidase durch die Pyridinole und das 2,4-Pyridindiol selbst konnte ausgeschlossen werden.

Alle Pyridindiole mit einer Hydroxylgruppe in β -Stellung zeigten dagegen eine Reaktion mit Peroxidase/ H_2O_2 . Als besonders oxydationsempfindlich zeigte sich das 2,6-Pyridindiol schon gegen Luftsauerstoff und Wasserstoffperoxid. Die Reaktionsgeschwindigkeit konnte durch Zusatz von Ferment lediglich erhöht werden.

Nähere Untersuchungen wurden der Oxydation des 2,5-Pyridindiols gewidmet. Es konnte die sehr rasche Bildung eines nicht beständigen Oxydationsproduktes beobachtet werden, welches sich bei der spektrophotometrischen Messung durch ein Maximum bei 513 nm auszeichnete. Es gelang dieses Produkt zu isolieren und durch Säulenchromatographie in 3 Komponenten zu zerlegen (Oxydationsprodukte A-C). Die Oxydationsprodukte A und B konnten rein isoliert, und das Oxydationsprodukt B auf anderem Wege, durch Oxydation mit Tetrachlor-o-chinon, dargestellt werden.

Zur Strukturaufklärung des Oxydationsproduktes A wurde dieses acetyliert, und die Struktur des entstandenen 2,5',5,5'-Tetraacetoxy-6,6'-dipyridyls durch Elementaranalyse, Molekulargewichtsbestimmung, IR- und NMR-Spektren bewiesen. Damit stellt das Oxydationsprodukt A das 2,2',5,5'-Tetrahydroxy-6,6'-dipyridyl dar und fügt sich in die Reihe der bei der Oxydation von Phenolen mit Peroxidase/ H_2O_2 gefundenen dimeren Phenole ein.

Das Oxydationsprodukt B wurde mit der von KUDERNATSCH (39) aus 2,3-Pyridindiol durch Oxydation mit MnO_2 und der von BOYER und KRUGER (15) aus 3- bzw. 5-Aminopyridon-2 durch Oxydation mit Kaliumbromat erhaltenen Substanz verglichen. Durch IR-Spektren und Schmelzpunktsvergleich der bei der reduzierenden Acetylierung erhaltenen Substanz konnte die Identität aller 3 Oxydationsprodukte bewiesen werden.

Die Summenformel dieser Substanz konnte durch Elementaranalyse und Molekulargewichtsbestimmung mit dem Dampfdruckosmometer mit $C_{22}H_{20}N_2O_{12}$ festgelegt werden. Die Acetylgruppenbestimmung ergab 6 Acetylgruppen für das Molekül. Die Substanz stellt ein Hexaacetoxypyridyl dar.

Kudernatsch bezeichnete das Oxydationsprodukt als Pyridinchinon, Boyer und Kruger fanden, daß neben der Oxydation zum Chinon eine Hydroxylierung stattgefunden hat. Beides kann nach den Ergebnissen dieser Arbeit als nicht richtig bezeichnet werden. Die Summenformel des Hexaacetoxypyridyls deutet zweifellos, neben einer Hydroxylierung, auf eine Dimerisierung des Pyridinkernes hin.

Das durch Massenspektrometrie erhaltene Molekulargewicht von 250 für das Oxydationsprodukt B gibt ebenfalls ein dimeres Pyridinderivat an. Da im NMR-Spektrum nur γ -Ringprotonen zu erkennen sind, wird für das Oxydationsprodukt B die Struktur eines Diazadiphenochinons angenommen. Da aus den vorliegenden Ergebnissen nicht zu sagen ist, in welcher Stellung des Moleküls hydroxyliert und dimerisiert wird, kann eine Entscheidung zwischen den Strukturformeln 2,2',5,5'-Tetrahydroxy-3,3'-diazadiphenochinon-(4,4') und 3,3',6,6'-Tetrahydroxy-2,2'-diazadiphenochinon-(4,4') für das Oxydationsprodukt B nicht getroffen werden. Für beide Strukturen muß außerdem das Vorhandensein von Diastereomeren angenommen werden, wobei die Bildung der Diastereomeren mit trans-ständigem Stickstoff bevorzugt sein sollte.

VI LITERATURVERZEICHNIS

- 1) ALBERT, A. in "Chemie der Heterocyclen", Verlag Chemie, Weinheim Bergstr., 1962, Seite 35
- 2) ALBERT, A. Ref. 1), Seite 58
- 3) ALBERT, A. J. chem. Soc., 1020 (1960)
- 4) ALBERT, A. und A. HAMPTON, J. chem. Soc., 505 (1954)
- 5) ALBERT, A. und J.N. PHILLIPS, J. chem. Soc., 1294 (1956)
- 6) BACH, A.N. und R. CHODAT, Ber.dtsch.chem.Ges. 36,600 (1903)
- 7) BARNES, R.A., in "Pyridine and Its Derivatives" Bd. I, herausgegeben von E.Klingsberg, Interscience Publ., Inc., New York, 1960, Seite 6
- 8) BAXENDALE, J.D. und H.R. HARDY, Trans. Faraday Soc. 49, 1140 (1953). Ref. in "Diss. Konstanten org. Säuren in wäss. Lösung", herausgegeben von G. Kortüm, W. Vogel und K. Andrussow, Butterworths, London, 1961, Seite 441
- 9) BEHRMANN, E.J. und B.M. PITT, J. Amer. chem. Soc. 80, 3717 (1958)
- 10) BELONOSOW, I.S. Zhur.Priklad.Khim. (J.Applied Chem.) 22,1103 (1949). Ref. in Chemical Abstracts 45,5650h (1951)
- 11) BERSON, J.A. J. Amer. chem. Soc. 75, 3521 (1953)
- 12) BIGGS, A.J. Trans. Faraday Soc. 52, 35 (1956). Ref. wie 8), Seite 430
- 13) BLIZNYUKOV, V.J. und V.M. REZNIKOV, Zhur. Obshehei Khim. 25, 1781 (1955). Ref. wie 47)
- 14) BOOTH, H. und B.C. SAUNDERS, J. chem. Soc., 940 (1956)
- 15) BOYER, J.H. und S. KRUGER, J. Amer. chem. Soc. 79, 3552 (1957)
- 16) BURTON, H. und P.F.G. PRAILL, J. chem. Soc., 755 (1952)
- 17) CARELLI, V., A.M. LIQUORI und A.MELE, Nature (London) 176,70 (1955)
- 18) CHANCE, B. Arch. Biochem. 22, 224 (1949)

- 19) CHANCE, B. und A.C. MAEHLY, in "Methods in Enzymology"
Bd. II, herausgegeben von S.P. Colowick
und H.O. Kaplan, Academic Press, New
York, 1955, Seite 770
- 20) D'ANNS, J. und E. LAX, in "Taschenbuch für Chemiker und
Physiker", Springer Verlag, Berlin-
Göttingen-Heidelberg, 1949, Seite 1592
- 21) DEN HERTOOG, H.J., J.P. WIBAUT, F.R. SCHEPMANN und
A.A. VAN DER WAL, Rec. trav. chim. 69,
700 (1950)
- 22) DIEDRICH, H. Dissertation Freie Universität Berlin
1967
- 23) ERRERA, G. Ber. dtsh. chem. Ges. 31, 1682 (1898)
- 24) GABRIEL, S. und J. COLMAN, Ber. dtsh. chem. Ges. 35,
2421 (1902)
- 25) GEORGE, P. Biochem. J. 54, 267 (1953)
- 26) HATHWAY, D.E. und I.W.T. SEAKINS, Biochem. J. 67, 239
(1957)
- 27) HINSBERG, O. Ber. dtsh. chem. Ges. 27, 3259 (1894)
- 28) HINSBERG, O. und O. HIMMELSCHEIN, Ber. dtsh. chem. Ges.
29, 2023 (1896)
- 29) HOFFMANN, L. und W. KÖNIGS, Ber. dtsh. chem. Ges. 16,
727 (1883)
- 30) HOLMES-SIEDLE, A.G. und B.C. SAUNDERS, Chem. and Ind.,
265 (1957)
- 31) HORNER, L. und W. DÜRKHEIMER, Z. Naturforsch. 14b, 741
(1959)
- 32) HOW, H. Annalen der Chemie und Pharmazie 80, 65
(1851)
- 33) HOWELL, R.R. und J.B. WYNGAARDEN, J. biol. Chem. 235,
3544 (1960)
- 34) KEILIN, D. und E.F. HARTREE, Biochem. J. 49, 88 (1951)
- 35) KEILIN, D. und T. MANN, Proc. Roy. Soc. 122B, 119 (1937)
Ref. 55), Seite 5
- 36) KOENIGS, E., H.CH. GERDES und A. SIROT, Ber. dtsh. chem.
Ges. 61, 1022 (1928)
- 37) KÖNIGS, E. und R. GEIGY, Ber. dtsh. chem. Ges. 17, 1835
(1884)

- 38) KRUBER, O. und L. RAPPEN, Ber. dtsh. chem. Ges. 81, 483 (1949)
- 39) KUDERNATTSCH, R. Monatshefte f. Chemie 18, 613 (1897)
- 40) LANGE, F.W. Arch. Biochim. Cosmetol. 9, 87, 185 (1966). Ref. in Chemical Abstracts 65, 19924g (1966). Dtsch. Apoth.-Ztg. 46, 1703 (1966)
- 41) LEZINA, V.P., V.F. BYSTROV, L.D. SMIRNOV und K.M. DYUMAEV, Teor. i Eksperim. Khim., Akad. Nauk Ukr. SSR 1(3), 218 (1956)
- 42) LINOSSIER, M.G.C.R., Soc. Biol. Paris 50, 373 (1898). Ref. (55), Seite 4
- 43) LOTH, H. Arch. Pharm. 294, 419; 498 (1962), 295, 161 (1962)
- 44) MACHEK, G. Monatshefte f. Chemie 73, 180 (1940)
- 45) MAEHLY, A.C. Biochim. biophys. Acta 8, 1 (1952)
Arch. Biochem. Biophys. 44, 430 (1953)
- 46) MASON, S.F. J. chem. Soc., 5010 (1957)
- 47) MATSUMURA, E. J. chem. Soc. Jap. 74, 446 (1953). Ref. in "Organ. Elektr. Spektral Data" Bd.II, Interscience Publishers, New York-London, 1966, Seite 30
- 48) MIKHAILOV, M.K. Doklady 121, 511 (1958)
- 49) NAKANISHI, K. in "Infrared Absorption Spectroscopy", Holden-Day, Inc., San Francisco und Nankodo Company Ltd. Tokyo, 1962. Seite 47 und 207
- 50) NAYLOR, F.T. und B.C. SAUNDERS, J. chem. Soc., 3519 (1950)
- 51) NEUBERG, C. und M. KOBEL, Naturwiss. 23, 800 (1935)
- 52) PESTEMER, M., in "Anleitung zum Messen von Absorptionsspektren im Ultraviolett und Sichtbaren", Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1964, Seite 50
- 53) PLANCHE, Bull. Pharm. 2, 578 (1810). Ref. (55), Seite 4
- 54) RUHEMANN, S. Ber. dtsh. chem. Ges. 27, 1272 (1894)
- 55) SAUNDERS, B.C., A.G. HOLMES-SIEDLE und B.P. STARK, in "Peroxidase", Butterworths, London,

1964, Seite 34

- 56) SAUNDERS, B.C., A.G. HOLMES-SIEDLE und B.P. STARK, in "Peroxidase", Butterworths, London, 1964, Seite 201, 211
- 57) SAUNDERS, B.C. und P.J.G. MANN, J. chem. Soc., 769 (1940)
- 58) SAUNDERS, B.C. und G.H.R. WATSON, Biochem. J. 46, 629 (1950)
- 59) v. SCHICK, O., A. BINZ und A. SCHULZ, Ber. dtsch. chem. Ges. 69, 2592 (1936)
- 60) SCHÖNBEIN, C.F. Verh. naturf. Ges. Basel 1, 339 (1855). Ref. (55), Seite 3
- 61) SPECKER, H. und H. GAWROSC, Ber. dtsch. chem. Ges. 75, 1338 (1942)
- 62) STARK, B.P. Ph. D. Dissertation, Cambridge, 1958. Ref. (55), Seite 209
- 63) STEINER, M. in "Methoden der Fermentforschung" Bd. I, herausgegeben von E. Bamann und K. Myrbäck, Verlag Georg Thieme, Leipzig, 1941, Seite 761
- 64) SUHR, H. in "Anwendungen der kernmagnetischen Resonanz in der organischen Chemie", Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1965, Seite 226
- 65) SWEDIN, B. und H. THEORELL, Nature 145, 71 (1940)
- 66) TEUBER, H.-J. und G. STAIGER, Chem. Ber. 88, 802 (1955)
- 67) THEORELL, H. und A. EHRENBERG, Arch. Biochem. 41, 442 (1952)
- 68) THIELE, J. Ber. dtsch. chem. Ges. 31, 1247 (1898)
- 69) UCKO, H. und H.W. BANSI, Z. physiol. Chem. 159, 235 (1926)
- 70) WESTERFELD, W.W. und C.J. LOWE, J. biol. Chem. 145, 463 (1942)
- 71) WILLSTÄTTER, R. und A. POLLINGER, Liebigs Ann. Chem. 430, 269 (1923)
- 72) ZEILE, K. in "Methoden der Fermentforschung" III/VIII, herausgegeben von E. Bamann und K. Myrbäck, Verlag Georg Thieme, Leipzig 1941, Seite 2601

Lebenslauf

Am 29. Mai 1937 wurde ich als Sohn des Eisenbahnbeamten Paul Eichner und seiner Ehefrau Elisabeth Eichner, geb. Drescher in Berlin-Neukölln geboren.

Von 1943-1947 besuchte ich die Volksschule und anschließend die II. Oberschule technischen Zweiges, von der ich 1955 mit der mittleren Reife auf die III. Oberschule wissenschaftlichen Zweiges in Berlin überwechselte. Im Frühjahr 1957 bestand ich dort das Abitur und ging anschließend als Praktikant in die Pannier Apotheke in Berlin-Neukölln. Nach der pharmazeutischen Vorprüfung begann ich im Frühjahr 1959 das Pharmaziestudium am Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin.

Im Herbst 1962 bestand ich die pharmazeutische Prüfung und arbeitete zunächst als Kandidat der Pharmazie in meiner Lehrapotheke. Zum November 1963 erhielt ich die Bestallung als Apotheker.

Im Herbst 1962 überließ mir Herr Professor Dr. H. Loth das Thema der vorliegenden Arbeit. Seit Oktober 1965 bin ich mit der Wahrnehmung der Dienstgeschäfte eines wissenschaftlichen Assistenten beauftragt.

